



**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785, 5993016 Fax (031) 5993015  
Laman: <http://www.fkh.unair.ac.id> ; e-mail: [info@fkh.unair.ac.id](mailto:info@fkh.unair.ac.id)

**SALINAN**

**KEPUTUSAN**  
**DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**NOMOR 100/UN3.1.6/2022**

Tentang

**PENGANGKATAN DOSEN PENGUJI UJIAN TERBUKA DISERTASI MAHASISWA**  
**PROGRAM STUDI S3 SAINS VETERINER**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**APRIL 2022**

**DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA,**

- Menimbang** : a. Bahwa dalam rangka melaksanakan Tri Dharma Perguruan Tinggi dipandang perlu mengangkat Dosen Penguji Ujian Terbuka Disertasi Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga April 2022;  
b. Sehubungan dengan butir (a) tersebut di atas, dipandang perlu menerbitkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mengingat** : 1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4301);  
2. Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5336);  
3. Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954 tentang Penetapan Universitas Airlangga di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954 (Lembaran Negara RI Tahun 1954 Nomor 99, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 695 juncto Lembaran Negara RI Tahun 1955 Nomor 748);  
4. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);  
5. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Negara Nomor 5535);  
6. Peraturan Pemerintah Nomor 8 Tahun 2020 tentang Perubahan Atas Peraturan Pemerintah Nomor 26 Tahun 2015 tentang Bentuk dan Mekanisme Pendanaan Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 28, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 6461);  
7. Surat Keputusan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia Nomor: 055/O/1972 tanggal 25 Maret 1972 tentang Pendirian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga;  
8. Keputusan Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia Nomor:232/U/2000 tentang Pedoman Penyusunan Kurikulum Pendidikan Tinggi dan Penilaian Hasil Belajar Mahasiswa;  
9. Peraturan Rektor Nomor 39 Tahun 2017 tentang Perubahan atas Peraturan Rektor Nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;



10. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor : 2158/H3/KR/2011 tanggal 7 Nopember 2011 tentang Izin Penyelenggaraan Program Studi Sains Veteriner Jenjang S-3 Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor : 762/UN3/2020 tanggal 30 September 2020 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana Periode 2020-2025 di lingkungan Universitas Airlangga.

Memperhatikan : Surat keputusan Rektor Nomor 698/UN3/2019 tentang Perpanjangan Izin Penyelenggaraan Program Studi di Lingkungan Universitas Airlangga,

**MEMUTUSKAN:**

Menetapkan : **KEPUTUSAN DEKAN TENTANG PENGANGKATAN DOSEN PENGUJI UJIAN TERBUKA DISERTASI MAHASISWA PROGRAM STUDI S3 SAINS VETERINER FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA APRIL 2022**

**PERTAMA** : Mengangkat para Dosen Penguji Ujian Terbuka Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Bulan April 2022 seperti tercantum dalam daftar lampiran Keputusan ini ;

**KEDUA** : Dosen Penguji Ujian Terbuka Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner dalam melaksanakan tugasnya berpedoman pada peraturan dan ketentuan yang berlaku dan mempertanggung jawabkan tugasnya kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga;

**KETIGA** : Keputusan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya  
Pada tanggal 1 April 2022

DEKAN,

ttd.

**MIRNI LAMID**  
NIP. 196201161992032001

Salinan disampaikan kepada Yth. :

1. Rektor Universitas Airlangga
2. Yang bersangkutan

Salinan sesuai dengan aslinya  
Kepala Bagian Tata Usaha



Hendra Gunarta, SE, M. PSDM  
NIP. 198002052000031002

**Lampiran :** Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Nomor 100/UN3.1.6/2022 tanggal 1 April 2022 tentang Dosen Penguji Ujian Terbuka Disertasi Mahasiswa Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Bulan April 2022.

**DOSEN PENGUJI UJIAN TERBUKA DISERTASI MAHASISWA  
PROGRAM STUDI S3 SAINS VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
APRIL 2022**

No.	Nama/NIM	Hari/Tanggal	Judul	Penguji
1	Kholik / 061717117304	Jum'at/ 1 April 2022	Karakter Gen Penyandi <i>Extended Spectrum Betaactamase (ESBL) Escherichia colidari Saluran Reproduksi Sapi Bali Yang Mengalami Repeat Breeder Di Pulau Lombok</i>	Prof. Dr. Mimi Lamid, drh., MP (Ketua) Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M. Kes (Anggota) Prof. Dr. Aulami'am, drh., DES (Anggota) Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP (Anggota) Prof. Muhammad Yunus, drh., M. Kes., Ph. D (Anggota) Dr. Epy Muhammad Luqman, drh., M. Si (Anggota) Dr. Lilik Maslachah, drh., M. Kes (Anggota) Dr. Tatik Hernawati, drh., M. Si (Anggota) Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh (Anggota)

Ditetapkan di Surabaya  
Pada tanggal 1 April 2022

DEKAN,

ttd.

**MIRNI LAMID**  
NIP. 196201161992032001

Salinan sesuai dengan aslinya  
Kepala Badan Tata Usaha



Heedro Gunario, SE, M. PSDM  
NIP. 198002052000031002

UJIAN TERBUKA

**KARAKTER GEN PENYANDI *EXTENDED SPECTRUM*  
*BETALACTAMASE* (ESBL) *Escherichia coli* DARI SALURAN  
REPRODUKSI SAPI BALI YANG MENGALAMI  
*REPEAT BREEDER* DI PULAU LOMBOK**

**PENELITIAN EPEDEMIOLOGI MOLEKULER**



Oleh

**KHOLIK**

**NIM. 061717117304**

**PROGRAM DOKTOR  
PROGRAM STUDI SAINS VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2022**

**PENELITIAN EPIDEMIOLOGI MOLEKULER**

**DISERTASI**

untuk memperoleh gelar Doktor dalam Program Studi Sains Veteriner pada  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

**Oleh**

**KHOLIK**

**NIM. 061717117304**

**PROGRAM DOKTOR  
PROGRAM STUDI SAINS VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2022**

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Disertasi berjudul:

**Karakter Gen Penyandi *Extended Spectrum Betalactamase (ESBL) Escherichia coli*  
dari Saluran Reproduksi Sapi Bali yang Mengalami *Repeat Breeder*  
di Pulau Lombok**

tidak terdapat karya yang penuh diajukan untuk memperoleh gelar Doktor di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 13 Agustus 2021



Kholik

NIM: 061717117304

**LEMBAR PENGESAHAN**  
**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI**

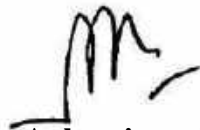
Oleh:

**Promotor**




**Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes**  
NIP. 195601051986011001

**Ko-Promotor**



**Prof. Dr. Aulanniam, drh., DES.**  
NIP:196009031988022001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Sains Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



**Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P**  
NIP: 196310021989032003

Disertasi ini telah diuji dan dinilai oleh Panitia Penguji  
Program Doktor Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Pada Tanggal: 13 Agustus 2021

Penetapan Panitia Penguji Disertasi

Telah diuji pada Tanggal: 13 Agustus 2021

**PANITIA PENGUJI DISERTASI**

Telah diuji pada Tanggal: 13 Agustus 2021

**PANITIA PENGUJI DISERTASI:**

1. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. (Ketua)
2. Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes. (Promotor)
3. Prof. Dr. Aulanni 'am, drh., DES. (Ko-Promotor)
4. Prof. Dr. Sarmanu, drh., M.S (Anggota)
5. Prof. Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., MSi. (Anggota)
6. Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si. (Anggota)
7. Dr. Budi Utomo, drh., M.Si. (Anggota)

SK Dekan Tentang Panitia Penguji Disertasi  
No. 2347/UN3.1.6/PK/2021  
Tanggal : 13 Agustus 2021



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT, sholawat dan salam kepada Rosulullah Muhammad SAW, sehingga penulis dapat melaksanakan ujian Disertasi dengan judul “Karakter Gen Penyandi *Extended Spectrum Betalactamase* (ESBL) *Escherichia coli* dari Saluran Reproduksi Sapi Bali yang Mengalami *Repeat Breeder* di Pulau Lombok”. Pada kesempatan ini penulis menghaturkan ucapan terima kasih dalam lahir dan bathin kepada :

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak., CMA yang memberi ijin dan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Dekan Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Mirni Lamid., drh., M.P., Dr. Rimayanti, drh., M.Kes, selaku Wakil Dekan I, Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si, selaku Wakil Dekan II dan penguji, Prof. Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH, selaku Wakil Dekan III, dan Ketua Program Studi Sains Veteriner Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P atas kesempatan mengikuti pendidikan di Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes selaku Promotor dan Prof. Dr. Aulanni’ám, drh., DES selaku ko-Promotor atas nasehat dan bimbingannya sampai dengan selesainya naskah Disertasi ini.

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS. Prof. Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., MSi., Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si., Almarhumah Dr. Nenny Hanjani, drh., M.Si (Allahumma yarham), Dr. Budi Utomo, drh., M.Si atas nasehat dan bimbingannya dalam menyempurnakan naskah Disertasi ini.

Seluruh Staf pengajar S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan Doktor di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Kedua Orang tua yang telah berpulang ke Rahmatullah (Allahumma yarham), keluarga Ibnul Bayan, para kyai, guru, serta teman - teman di Mustajabullatifah, atas restu dan doa selama menempuh Pendidikan di Universitas Airlangga.

Haji Lalu Rusmiady, SH., MM, dan Drs. H. Lalu Azhar selaku Pembina dan Ketua Yayasan Pembina IKIP Mataram, serta Rektor dan seluruh civitas akademika Universitas Pendidikan Mandalika atas restu dan dukungan selama menempuh pendidikan Doktor di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Institut Biosain dan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang telah memfasilitasi dan membantu dalam penelitian disertasi ini.

Penulis mengucapkan terima kasih pada semua pihak yang telah membantu dalam terselesaikannya disertasi, semoga Allah SWT melimpahkan taufik dan hidayah-Nya. Amiin Ya Rabbal Alamin.

Surabaya, 13 Agustus 2021

Kholik

## RINGKASAN

### **Karakter Gen Penyandi *Extended Spectrum Betalactamase* (ESBL) *Escherichia coli* dari Saluran Reproduksi Sapi Bali yang Mengalami *Repeat Breeder* di Pulau Lombok**

**Kholik**

Kasus *repeat breeder* pada sapi Bali di Propinsi Nusa Tenggara Barat sebagai penyuplai daging nasional telah dilaporkan sebesar 24,9%. Penanganan kasus *repeat breeder* tidak lepas dari penggunaan antibiotik. Antibiotik golongan  $\beta$ -lactam merupakan salah satu antibiotik yang sering digunakan pada sapi di peternakan rakyat, pemberian antibiotik dalam dosis sub-terapeutik dan dengan paparan yang lama akan menciptakan kondisi ideal pada bakteri untuk memproduksi gen resistensi. Gen yang banyak dibicarakan adalah gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli*. Variasi Gen penyandi ESBL tipe TEM dan tipe CTX-M pada *Escherichia coli* telah ditemukan pada hewan produksi dan manusia. *Escherichia coli* penyandi gen resisten ESBL dapat menyebar dan berimbas pada kesehatan manusia dan lingkungan yang sampai saat ini masih dalam perdebatan mengenai kontribusi hewan produksi terhadap timbulnya *Antimicrobial Resistance* (AMR) dalam domain *One Health* karena masih minimnya data tentang *Escherichia coli* penyandi gen resisten asal hewan yang berhubungan dengan infeksi pada manusia dan lingkungan.

Kejadian *repeat breeder* yang cukup tinggi pada sapi Bali sebagai hewan produksi daging di Nusa Tenggara Barat, khususnya di Pulau Lombok yang kaya akan peternakan rakyat dan kurangnya edukasi tentang AMR, maka perlu dilakukan penelitian tentang gen penyandi ESBL yang diproduksi *Escherichia coli* dari sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* di Pulau Lombok yang belum dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* resisten terhadap antibiotik, mempunyai gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang secara *phylogenetic tree* memiliki kedekatan dengan data yang ada di *GenBank*. Penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan tentang asal *Escherichia coli* penyandi ESBL pada sapi Bali dengan analisis *phylogenetic tree* dihubungkan dengan *Escherichia coli* penyandi ESBL asal hewan, manusia dan lingkungan sehingga akan menjawab peran sapi Bali sebagai hewan produksi pada peternakan rakyat terhadap timbulnya AMR.

Penelitian ini merupakan studi *cross-sectional* yang dilakukan pada Bulan Maret sampai Juni 2021 dengan menggunakan 22 ekor sapi Bali betina yang mengalami *repeat breeder* di peternakan rakyat untuk diambil cairan saluran reproduksinya sebagai sampel menggunakan *plastic sheet gun* inseminasi buatan dan diletakkan pada medium BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*). Kultur

*Escherichia coli* dilakukan pada *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dan diidentifikasi dengan uji biokimia. Uji kepekaan antibiotik pada sampel *Escherichia coli* dilakukan dengan metode difusi cakram pada Media Mueller Hinton Agar dengan menggunakan 5 antibiotik antara lain *Penicillin G* 10 U, *Oxytetracycline* 30 µg, *Gentamicin* 10 µg, dan *Tetracycline* 30 µg serta *Cefotaxime* 30 µg. Uji indikasi adanya *Escherichia coli* ESBL dengan metode *double-disk approximation test* menggunakan *Cefotaxime* (CTX) 30 µg dan *Amoxicillin-Clavulanate* (AMC) 30 µg. Karakter gen penyandi *extended spectrum beta-lactamase* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) yang diamplifikasi dengan primer gen blaTEM, blaCTX-M, dan blaVEB yang dilanjutkan dengan analisis sekuensing dan *phylogenetic tree*.

Hasil dari kultur *Escherichia coli* pada media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) didapatkan 5 (22,7%) bakteri *Escherichia coli* yang diisolasi dari 22 sampel cairan saluran reproduksi sapi Bali. Hasil penelitian tentang uji kepekaan terhadap antibiotik dari 5 (lima) *Escherichia coli* yang diisolasi didapatkan bahwa 5 (100%) *Escherichia coli* resisten terhadap *Penicillin G*, 4 (80%) *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Oxytetracycline*, 4 (80%) *Escherichia coli* resisten terhadap *Gentamicin*, dan hanya satu (20%) *Escherichia coli* resisten terhadap *Tetracycline*, serta 3 (60%) *Escherichia coli* resisten terhadap *Cefotaxime*. *Escherichia coli* resisten terhadap *Cefotaxime* menunjukkan hasil positif pada uji adanya ESBL dengan metode *double-disk approximation test* menggunakan *Cefotaxime* dan *Amoxicillin-Clavulanate*.

Hasil analisis kemurnian ekstraksi DNA dari 5 *Escherichia coli* yang telah diisolasi diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer berdasarkan rasio absorbansi  $\lambda=260$  nm terhadap nilai absorbansi  $\lambda=280$  nm berada diantara 1,60-2,4, sedangkan berdasarkan rasio absorbansi  $\lambda=230$  nm terhadap nilai absorbansi  $\lambda=260$  nm berada diantara 0,83-1,88. Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* secara kualitatif dengan elektroforesis menunjukkan bahwa DNA *Escherichia coli* berada pada 9 kilobase pair (kb). Hasil PCR menunjukkan 3 *Escherichia coli* positif menyandi kombinasi gen blaTEM dan blaCTX-M dari 5 *Escherichia coli* yang telah diisolasi. Gen blaTEM pada posisi 1100 bp dan 560 bp, sedangkan gen blaCTX-M berada pada posisi 370 bp. Hasil analisis *phylogenetic tree* dari *Escherichia coli* penyandi gen blaTEM ESBL berkerabat dengan *Escherichia coli* isolat GD8 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116 (blaTEM) yang berasal dari hewan ternak, *Escherichia coli strain U-10 TEM family beta-lactamase* (blaTEM) yang berasal dari feses manusia dan *Escherichia coli S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM206* yang diisolasi dari manusia. Sampel *Escherichia coli* penyandi gen blaCTX-M ESBL berkerabat dengan *Escherichia coli strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14* (blaCTX-M) yang merupakan isolat klinik dari manusia.

Pada penelitian ini dapat membuktikan bahwa *Escherichia coli* dapat diisolasi dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* 100% resisten terhadap *Penicillin* dan 60% resisten terhadap *Cefotaxime*. *Escherichia coli* yang telah diisolasi dari cairan reproduksi sapi Bali menyandi kombinasi antara gen

blaTEM dengan gen blaCTX-M yang berasal dari hewan ternak, lingkungan, dan isolat klinik dari manusia. Hal ini menjelaskan bahwa sapi Bali sebagai hewan produksi pada peternakan rakyat dapat berkontribusi terhadap timbulnya AMR dalam domain *One Health*.

## SUMMARY

### **Characteristics of Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL) *Escherichia coli* Encoding Genes from the Bali Cattle Reproductive Tract that Had a Repeat Breeder on Lombok Island**

**Kholik**

The number of repeat breeders in Bali cattle in West Nusa Tenggara Province as a national meat supplier has been reported at 24.9%. Handling cases of repeat breeders can not be separated from the use of antibiotics. Antibiotics of the  $\beta$ -lactam group are one of the antibiotics that are often used in cattle in smallholder farms, giving antibiotics in sub-therapeutic doses and with prolonged exposure to create ideal conditions for bacteria to produce resistance genes. The gene that is widely discussed is the gene encoding the Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) produced by *Escherichia coli*. Variations of the TEM-type and CTX-M-type ESBL encoding genes in *Escherichia coli* have been found in production animals and humans. *Escherichia coli* encoding the ESBL resistance gene can spread and affect human health and the environment, which is currently still under debate regarding the contribution of production animals to the emergence of Antimicrobial Resistance (AMR) in the One Health domain because there is still minimal data on *Escherichia coli* encoding resistance genes from animals originating from animals. associated with infection in humans and the environment.

The incidence of repeat breeders is quite high in Bali cattle as meat production animals in West Nusa Tenggara, especially on the island of Lombok which is rich in smallholder farms and lack of education about AMR, it is necessary to research the ESBL coding gene produced by *Escherichia coli* from Bali cattle experiencing repeat breeder on Lombok Island that has not been reported. This study aimed to prove that *Escherichia coli* from the reproductive tract fluid of Bali cattle which experienced repeat breeders were resistant to antibiotics, had the gene encoding Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) which phylogenetically tree was close to the data in GenBank. This study is expected to explain the origin of *Escherichia coli* encoding ESBL in Bali cattle by phylogenetic tree analysis associated with *Escherichia coli* encoding ESBL originating from animals, humans, and the environment so that it will answer the role of Bali cattle as production animals on smallholder farms against the incidence of AMR.

This research is a cross-sectional study conducted from March to June 2021 using 22 female Bali cattle that underwent repeat breeders on smallholder farms to have their reproductive tract fluids taken as samples using an artificial insemination plastic sheet gun and placed on BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) medium. Culture *Escherichia coli* was carried out on Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) and identified by biochemical tests. Antibiotic susceptibility test on *Escherichia coli* samples was

carried out by disc diffusion method on Mueller Hinton Agar media using 5 antibiotics including Penicillin G 10 U, Oxytetracycline 30 g, Gentamicin 10 g, and Tetracycline 30 g and Cefotaxime 30 g. Test for indication of *Escherichia coli* ESBL by double-disk approximation test method using Cefotaxime (CTX) 30 g and Amoxicillin-Clavulanate (AMC) 30 g. The character of the gene encoding extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) produced by *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) amplified with primers for the blaTEM, blaCTX-M, and blaVEB genes followed by sequencing and phylogenetic tree analysis.

The results of *Escherichia coli* culture on Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) media showed 5 (22.7%) *Escherichia coli* bacteria isolated from 22 samples of Bali cattle reproductive tract fluid. The results of the research on the antibiotic susceptibility test of 5 (five) *Escherichia coli* isolated found that 5 (100%) *Escherichia coli* were resistant to Penicillin G, 4 (80%) *Escherichia coli* was resistant to Oxytetracycline, 4 (80%) *Escherichia coli* was resistant to Gentamicin, and only one (20%) *Escherichia coli* was resistant to Tetracycline, and 3 (60%) *Escherichia coli* was resistant to Cefotaxime. *Escherichia coli* resistant to Cefotaxime showed positive results in the test for the presence of ESBL by double-disk approximation test method using Cefotaxime and Amoxicillin-Clavulanate.

The results of the analysis of the purity of DNA extraction from 5 *Escherichia coli* that have been isolated were measured quantitatively using a spectrophotometer based on the absorbance ratio  $\lambda = 260$  nm to the absorbance value  $\lambda = 280$  nm between 1.60-2.4, while based on the absorbance ratio  $\lambda = 230$  nm to the absorbance value  $\lambda = 260$  nm is between 0.83-1.88. The results of qualitative *Escherichia coli* DNA extraction by electrophoresis showed that *Escherichia coli* DNA was in 9 kilobase pairs (kb). The PCR results showed that 3 *Escherichia coli* were positive for the combination of blaTEM and blaCTX-M genes from 5 *Escherichia coli* that has been isolated. The blaTEM gene was at the 1100 bp and 560 bp positions, while the blaCTX-M gene was at the 370 bp position. The results of the phylogenetic tree analysis of *Escherichia coli* encoding the blaTEM ESBL gene related to *Escherichia coli* isolate GD8 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116 (blaTEM) derived from livestock, *Escherichia coli* strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM) derived from human feces and *Escherichia coli* S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM206 isolated from humans. *Escherichia coli* samples encoding the blaCTX-M ESBL gene are related to *Escherichia coli* strain EC271 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) which is a clinical isolate from humans.

In this study, it was proven that *Escherichia coli* could be isolated from the reproductive tract fluid of Bali cattle which experienced repeat breeders 100% resistant to Penicillin and 60% resistant to Cefotaxime. *Escherichia coli* which has been isolated from the reproductive fluid of Bali cattle is a combination of the blaTEM gene with the blaCTX-M gene from livestock, the environment, and clinical isolates from humans. This explains that Bali cattle as production animals on smallholder farms can contribute to the emergence of AMR in the One Health domain.

## ABSTRAK

### Karakter Gen Penyandi *Extended Spectrum Betalactamase* (ESBL) *Escherichia coli* dari Saluran Reproduksi Sapi Bali yang Mengalami *Repeat Breeder* di Pulau Lombok

Kholik

Kontribusi hewan produksi terhadap timbulnya *Antimicrobial Resistance* (AMR) dalam domain *One Health* masih dalam perdebatan. Penelitian bertujuan untuk membuktikan *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* resisten terhadap antibiotik, mempunyai gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang secara *phylogenetic tree* memiliki kedekatan dengan data yang ada di *GenBank*. Penelitian ini dilakukan pada Bulan Maret sampai Juni 2021 dengan menggunakan 22 ekor sapi Bali betina yang mengalami *repeat breeder* pada peternakan rakyat untuk diambil cairan saluran reproduksinya menggunakan *plastic sheet gun*. Kultur *Escherichia coli* dilakukan pada *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dan diidentifikasi dengan uji biokimia. Uji kepekaan antibiotik pada sampel *Escherichia coli* dilakukan dengan metode difusi cakram menggunakan 5 antibiotik antara lain *Penicillin G*, *Oxytetracycline*, *Gentamicin*, *Tetracycline*, dan *Cefotaxime*. Uji adanya *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL dengan metode *double-disk approximation test* menggunakan *Cefotaxime* 30  $\mu$ g dan *Amoxicillin-Clavulanate* 30  $\mu$ g. Karakterisasi gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) yang diamplifikasi dengan primer gen *blaTEM*, *blaCTX-M*, dan *blaVEB* yang dilanjutkan dengan analisis *phylogenetic tree*. Hasil dari kultur *Escherichia coli* pada media EMBA didapatkan 5 (22,7%) bakteri *Escherichia coli* yang telah diisolasi dari 22 sampel cairan reproduksi sapi Bali. Hasil uji kepekaan *Escherichia coli* terhadap antibiotik didapatkan bahwa *Escherichia coli* 100% resisten terhadap *Penicillin G*, 80% resisten terhadap *Oxytetracycline*, 80% resisten terhadap *Gentamicin*, dan 20% resisten terhadap *Tetracycline*, serta 60% resisten terhadap *Cefotaxime* dari 5 *Escherichia coli* yang diisolasi. *Escherichia coli* yang resisten *Cefotaxime* menunjukkan hasil positif pada uji adanya ESBL menggunakan *Cefotaxime* dan *Amoxicillin-Clavulanate*. Hasil PCR membuktikan 3 *Escherichia coli* menyandi kombinasi gen *blaTEM* dan *blaCTX-M* dari 5 *Escherichia coli* yang telah diisolasi. Hasil analisis *phylogenetic tree* menyatakan bahwa *Escherichia coli* berkerabat dengan *Escherichia coli* isolat GD8 *blaTEM*-116 yang berasal dari hewan ternak, *Escherichia coli* *blaTEM* strain U-10 dan *Escherichia coli* S2.2-EK *blaTEM*206, serta *Escherichia coli* strain EC271 *blaCTX-M*-14 yang berasal dari manusia. Hal ini menjelaskan bahwa sapi Bali sebagai hewan produksi dapat berkontribusi terhadap timbulnya AMR dalam domain *One Health*.

**Keyword:** Gen ESBL, *Escherichia coli*, *repeat breeder*, Sapi Bali



## ABSTRACT

### Characteristics of Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL) *Escherichia coli* Encoding Genes from the Bali Cattle Reproductive Tract that Had a Repeat Breeder on Lombok Island

**Kholik**

The contribution of production animals to the emergence of Antimicrobial Resistance (AMR) in the One Health domain is still under debate. This study aimed to prove that *Escherichia coli* from the reproductive tract fluid of Bali cattle which experienced repeat breeders were resistant to antibiotics, had the gene encoding Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) which phylogenetically tree was close to the data in GenBank. This research was conducted from March to June 2021 using 22 female Bali cattle that experienced repeat breeders on smallholder farms to collect their reproductive tract fluids using a plastic sheet gun. *Escherichia coli* cultures were performed on Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) and identified by biochemical tests. Antibiotic susceptibility test on *Escherichia coli* samples was carried out by disc diffusion method using 5 antibiotics, namely Penicillin G, Oxytetracycline, Gentamicin, Tetracycline, and Cefotaxime. Test for the presence of *Escherichia coli* that produces ESBL by double-disk approximation test method using Cefotaxime 30 g and Amoxicillin-Clavulanate 30 g. Characterization of the gene encoding Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) produced by *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) amplified with primers for the blaTEM, blaCTX-M, and blaVEB genes followed by phylogenetic tree analysis. The results of *Escherichia coli* culture on EMBA media showed 5 (22.7%) *Escherichia coli* bacteria which had been isolated from 22 samples of Bali cattle reproductive fluid. The results of the sensitivity test of *Escherichia coli* to antibiotics showed that *Escherichia coli* was 100% resistant to Penicillin G, 80% resistant to Oxytetracycline, 80% resistant to Gentamicin, 20% resistant to Tetracycline, and 60% resistant to Cefotaxime from 5 *Escherichia coli* isolated. Cefotaxime-resistant *Escherichia coli* showed positive results in the test for the presence of ESBL using Cefotaxime and Amoxicillin-Clavulanate. The PCR results proved that 3 *Escherichia coli* were the combination of the blaTEM and blaCTX-M genes from 5 *Escherichia coli* that had been isolated. The results of the phylogenetic tree analysis state that *Escherichia coli* is related to *Escherichia coli* isolate GD8 blaTEM-116 originating from livestock, *Escherichia coli* blaTEM strain U-10 and *Escherichia coli* S2.2-EK blaTEM206, and *Escherichia coli* strain EC271 blaCTX-M-14 originating from humans. This explains that Bali cattle as production animals can contribute to the emergence of AMR in the One Health domain.

**Keywords:** *Escherichia coli*, ESBL genes, repeat breeder, Bali cattle

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPEL DEPAN.....	i
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	xi
ABSTRAK.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xxi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.3.1 Tujuan Umum.....	9
1.3.2 Tujuan Khusus.....	9
1.4 Manfaat Penelitian.....	10
1.4.1 Manfaat teoritis.....	10
1.4.2 Manfaat praktis.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	12
2.1 <i>Eschericia coli</i> .....	12
2.2 <i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-Lactamases</i> .....	14
2.3 Epidemiologi <i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-Lactamases (ESBL) Eschericia coli</i> .....	16
2.4 Pemeriksaan <i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-Lactamases (ESBL) Eschericia coli</i> .....	17
2.4.1 Skiring <i>Extended Betalactamases (ESBL) Eschericia coli</i> .....	17

2.4.2 Uji Molekuler <i>Extended Betalactamases (ESBL) E.coli</i> .....	19
2.5 Kejadian <i>Repeat Breeder</i> Pada Sapi Bali di Nusa Tenggara Barat.....	20
2.6 Profil Peternakan di Pulau Lombok.....	22
<b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN</b> .....	<b>25</b>
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	25
<b>BAB IV MATERI DAN METODE PENELITIAN</b> .....	<b>29</b>
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	29
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	29
4.3 Identifikasi Variabel Penelitian .....	30
4.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian .....	30
4.5 Alat dan Bahan Penelitian .....	31
4.6 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	33
4.7 Prosedur Penelitian .....	34
4.7.1 Pengambilan sampel .....	34
4.7.2 Kultur <i>Escherichia coli</i> .....	34
4.7.3 Pewarnaan Gram.....	35
4.7.4. Tes Biokimia.....	35
4.7.5 Uji Kepekaan Antibiotik.....	37
4.7.6 Ekstraksi DNA <i>Escherichia coli</i> .....	39
4.7.7 PCR ( <i>Polymeration Chain Reaction</i> ) Gen penyandi ESBL.....	40
4.7.8. Elektroforesis Gel Agarosa.....	41
4.8 Analisis data .....	42
4.9 Kerangka Operasional Penelitian .....	43
<b>BAB V HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>44</b>
5.1 Isolasi dan Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	44
5.2 Uji Kepakaan Terhadap Atibiotik.....	47
5.3 Ekstraksi DNA <i>Escherichia coli</i> .....	51
5.4 PCR gen TEM, CTX-M dan VEB <i>Escherichia coli</i> .....	53

BAB VI PEMBAHASAN.....	71
6.1 Analisis Kultur <i>Escherichia coli</i> .....	71
6.2 Analisis Uji Kepakaan Terhadap Atibiotik dan Skrining ESBL.....	72
6.3 Analisis PCR gen TEM, CTX-M dan VEB <i>Escherichia coli</i> .....	74
6.4 Analisis <i>Phylogenic tree</i> Gen TEM dan CTX-M <i>Escherichia coli</i> .....	77
6.5 Temuan Baru.....	85
6.6 Keterbatasan Penelitian.....	86
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	87
7.1 Kesimpulan .....	87
7.2 Saran .....	88
DAFTAR PUSTAKA.....	89
LAMPIRAN .....	96

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Hasil Uji Skrining Antibiotik ESBL <i>Escherichia coli</i> .....	18
Tabel 2.2 Jumlah Populasi Sapi Potong di Nusa Tenggara Barat (2017-2019).....	23
Tabel 3.1 Urutan Basa Nukleotida Primer dan Referensi.....	41
Tabel 5.1 Rekapitulasi Sampel Cairan Reproduksi Sapi Bali.....	44
Tabel 5.2 Hasil Uji Biokimia <i>Escherichia coli</i> dari Sapi Bali.....	47
Tabel 5.3 Zona Hambat Uji Kepekaan <i>Escherichia coli</i> Terhadap Antibiotik.	49
Tabel 5.4 Konsentrasi dan Kemurnian Ekstraksi DNA <i>Escherichia coli</i> ..	51
Tabel 5.5 Data Primer Gen Target ESBL <i>Escherichia coli</i> . .....	54
Tabel 5.6 Gen ESBL <i>Escherichia coli</i> Berdasar Letak Pengambilan Sampel.	69
Tabel 6.1 Analisis <i>Blasting</i> Gen TEM Sampel ESBL <i>E. coli</i> pada NCBI.	80
Tabel 6.2 Analisis <i>Blasting</i> Gen CTX-M Sampel ESBL <i>E. coli</i> pada NCBI.	82

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi <i>Escherichia coli</i> pada MacConkey Agar .....	12
Gambar 2.2 Ekpresi ESBL <i>Escherichia coli</i> pada Difusi Cakram Ganda ..	19
Gambar 2.3 Gambar Sapi Bali .....	20
Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian.....	43
Gambar 5.1 Koloni <i>Escherichia coli</i> pada pada Media EMBA.....	45
Gambar 5.2 Morfologi <i>Escherichia coli</i> dengan Pewarnaan Gram. ....	46
Gambar 5.3 Hasil Uji Kepekaan <i>Escherichia coli</i> Terhadap Antibiotik.....	48
Gambar 5.4 Hasil Uji <i>Double-Disk Diffusion Escherichia coli</i> .....	50
Gambar 5.5 Hasil Elektroferosis Ekstaraksi DNA <i>Escherichia coli</i> .....	52
Gambar 5.6 Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaVEB, blaTEM, blaCTX-M <i>E. coli</i> dengan PCR. ....	55
Gambar 5.7 Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaTEM <i>E. coli</i> dengan PCR.....	56
Gambar 5.8 Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaCTX-M <i>E. coli</i> dengan PCR .....	57
Gambar 5.9 Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaVEB <i>E. coli</i> dengan PCR .....	58
Gambar 5.10 <i>Phylogenetic Tree E. coli</i> Penyandi Gen TEM dari Sapi Bali dengan Berbagai Referensi di NCBI Menggunakan <i>Neighbor- Joining method</i> .....	61

Gambar 5.11 <i>Phylogenetic Tree E. coli</i> Penyandi Gen CTX-M dari Sapi Bali dengan Berbagai Referensi di NCBI Menggunakan <i>Neighbor-Joining method</i> .....	66
Gambar 5.12 <i>Phylogenetic Tree E. coli</i> Penyandi Gen TEM dan CTX-M dari Sapi Bali dengan Berbagai Referensi di NCBI Menggunakan <i>Neighbor-Joining method</i> .....	67

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

AMR	=	<i>Antimicrobial resistance</i>
ATCC	=	<i>American Type Culture Collection</i>
Bp	=	<i>Base Pair</i>
CDC	=	<i>Centre for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	=	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX	=	<i>Cefotaxime</i>
DNA	=	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	=	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
ESBL	=	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i>
EMBA	=	<i>Eosin Methylene Blue Agar</i>
FAO	=	<i>Food and Agriculture Organization</i>
F	=	<i>Forward</i>
MIC	=	<i>Minimum Inhibition Concentration</i>
MgCl <sub>2</sub>	=	<i>Magnesium Chloride</i>
NCBI	=	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTB	=	<i>Nusa Tenggara Barat</i>
OXA	=	<i>Oxacillin</i>
PCR	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R	=	<i>Reverse</i>
SDGs	=	<i>Sustainable Development Goals</i>



SHV	=	<i>Sulphydryl Variable</i>
USAID	=	<i>United States Agency for International Development</i>
TEM	=	<i>Temoneira</i>
TSI	=	<i>Triple sugar iron</i>
WHO	=	<i>World Health Organization</i>

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Kasus gangguan reproduksi yang masih menjadi masalah dalam peternakan sapi di Nusa Tenggara Barat. Dibia dkk. (2015) melaporkan bahwa kasus kejadian kawin berulang (*repeat breeder*) pada sapi Bali di Nusa Tenggara Barat telah dilaporkan sebesar 24,9 % dari 2.127 kasus gangguan reproduksi. Kasus kawin berulang dapat disebabkan oleh adanya bakteri dalam uterus. Gani *et al.* (2008) telah melaporkan kasus kawin berulang akibat bakteri di dalam uterus sebesar 37,9%, dan faktor lain sebanyak 62,2%. Infeksi bakteri dalam uterus dalam penanganannya akan memerlukan antibiotik. Antibiotik golongan  $\beta$ -lactam merupakan salah satu antibiotik yang sering digunakan pada peternakan dan telah menimbulkan gen resistensi (Huang *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2019).

Penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol akan memberikan tekanan pada bakteri untuk bermutasi sehingga akan menimbulkan gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang berimplikasi pada timbulnya *antimicrobial resistance* (AMR). Holmes *et al.* (2016) menyatakan bahwa munculnya resistensi antimikroba adalah respon evolusioner alami terhadap paparan antimikroba. Paparan antibiotik pada dunia peternakan, masyarakat dan lingkungan akan saling terkait dan dapat meningkatkan prevalensi mikroorganisme yang resisten, terutama dari penggunaan pada manusia, pertanian dan peternakan serta polusi lingkungan.

Gen penyandi ESBL yang dihasilkan oleh bakteri dan menyebabkan AMR akan memberikan kontribusi pada eksistensi kesehatan hewan, kesehatan manusia, dan kesehatan lingkungan sehingga dalam penanganannya memerlukan pendekatan *One Health*. *One Health* didefinisikan sebagai upaya kolaboratif dari berbagai disiplin ilmu untuk mencapai kesehatan yang optimal bagi manusia, hewan, dan lingkungan (AVMA, 2008). Kolaboratif dari ketiga domain antara lain dari kesehatan manusia, hewan, dan lingkungan, maka kesehatan hewan menjadi perhatian dengan ditemukannya variasi gen penyandi resistensi yang diproduksi *Escherichia coli* pada sapi baik pada peternakan, rumah potong hewan dan lingkungan disekitar peternakan. Salah satu gen resistensi yang diproduksi *Escherichia coli* dan banyak dibicarakan adalah gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).

*Escherichia coli* dijadikan indikator karena profil *Antimicrobial resistance* (AMR) dari *Escherichia coli* hampir mencerminkan penggunaan antimikroba pada hewan produksi (EFSA, 2011). *Escherichia coli* yang resisten terhadap ceftazidime yang merupakan generasi sefalosporin sebesar 0.0-0,12% telah diisolasi dari lingkungan seperti feses, tempat kotoran, dan saluran pembuangan air (Adator *et al.*, 2020). *Escherichia coli* dengan gen *multidrug resistant* juga ditemukan pada manusia dengan prevalensi yang cukup tinggi (Robinson *et al.*, 2016). Sampai saat ini telah ditemukan berbagai variasi Gen penyandi ESBL tipe TEM (*Temoneira*) dan tipe CTX-M (*Cefotaxime*) pada *Escherichia coli* pada hewan produksi, manusia dan lingkungan.

Prevalensi *Enterobacteriaceae* termasuk *Escherichia coli* penghasil ESBL tipe CTX-M yang sangat tinggi dilaporkan sebesar 65,7% di Thailand yang berasal dari 417 sampel feses manusia dewasa yang tinggal di daerah rural (Luvsansharav *et al.*, 2012). Gen penyandi CTX-M-1 dan CTX-M-9 yang diproduksi *Escherichia coli* telah diisolasi sebesar 8.6% dari 220 sampel feses sapi pada rumah potong hewan di Bogor (Sudarwanto *et al.*, 2016). *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL gen penyandi tipe TEM dan CTX-M juga telah ditemukan pada feses sapi dan lingkungan di Peninsular Malaysia (Kamaruzzaman *et al.*, 2020). *Escherichia coli* penyandi gen ESBL CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15, SHV-12, dan CMY-2. CTX-M-14 dan CTX-M-15 dinyatakan telah menyerang manusia (Widodo, *et al.*, 2020).

Nusa Tenggara Barat (NTB) yang terdiri dari Pulau Lombok dan Pulau Sumbawa merupakan salah satu provinsi yang kaya akan peternakan rakyat dan penyuplai sapi potong nasional. Data BPS Provinsi NTB sampai tahun 2019 menyatakan bahwa jumlah populasi sapi di NTB adalah 1. 234. 357 ekor. Pada tahun 2013 di Kabupaten Lombok Timur terdapat sekitar 504 kelompok tani ternak yang terdiri dari kelas pemula berjumlah 238 kelompok, kelas lanjut berjumlah 236 kelompok, dan kelas madya berjumlah 30 kelompok (Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi NTB, 2015).

Data yang menyatakan bahwa banyaknya peternak pemula apabila kurang edukasi tentang pengetahuan tentang manajemen sanitasi dan penanganan yang terkait dengan reproduksi seperti perawatan pasca partus, deteksi birahi, penanganan kasus distokia, perawatan pasca penanganan retensi plasenta dan

prolapsus uterus akan menjadi pemicu terjadinya kontaminasi bakteri pada saluran reproduksi dan timbulnya resistensi mikroba termasuk gen penyandi resistensi yang diproduksi *Escherichia coli*. Rafika dkk. (2020) menyatakan bahwa faktor predisposisi penyebab *repeat breeder* adalah akibat infeksi bakteri saat penanganan kasus distokia, retensi plasenta, prolapsus uterus, dan gangguan ovarium.

Kontaminasi *Escherichia coli* juga bisa akibat lingkungan yang kurang baik terutama pasca partus. Lingkungan yang kurang baik pasca partus akan memudahkan masuknya mikroba ke dalam lumen uterus, mencemari lingkungan lumen uterus, mengganggu kehidupan embrio yang dapat menyebabkan kematian embrio dini (Arthur *et al.*, 2001). Sheldon *et al.* (2008) menyatakan bahwa infeksi pada uterus bisa disebabkan oleh keadaan lingkungan saat melahirkan, namun retensi plasenta yang merupakan predisposisi paling penting.

Peternakan rakyat sebagai salah satu penyuplai protein hewani apabila kurang diperhatikan, khususnya pada masyarakat di Pulau Lombok akan menambah kompleksitas timbulnya *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik karena peternakan rakyat pada umumnya memelihara ternak sebagai tabungan dan kadang hidup bersama dalam satu rumah, sehingga transfer gen resisten antara hewan ternak dan manusia serta lingkungan akan cepat terjadi, apalagi masyarakat peternak kurang edukasi tentang penggunaan antibiotik dan akibatnya. Founou *et al.* (2020) menyatakan bahwa munculnya AMR dalam sebelum dan sesudah panen dalam peternakan menimbulkan risiko serius dalam kontaminasi langsung oleh bakteri resisten terhadap antibiotik kepada petani, praktisi pertanian, pekerja rumah potong hewan, dan pekerja penanganan pangan

asal hewan, sehingga berhubungan dengan keamanan pangan dalam rantai pangan dari peternakan ke konsumen.

Kenyataan di lapangan dalam penggunaan antibiotik pada penanganan kasus penyakit pada ternak sapi dalam gangguan reproduksi termasuk *repeat breeder* dalam dosis sub-terapeutik sangat memungkinkan dikarenakan keterbatasan sumber daya manusia dalam hal ini dokter hewan dan medan yang cukup berat serta memerlukan jarak tempuh yang cukup lama, sehingga pemberian antibiotik yang memerlukan ulangan mungkin tidak terjadi, sehingga dosis terapi tidak tercapai. Dosis sub-terapeutik dengan periode paparan yang lama akan menciptakan kondisi ideal bagi bakteri untuk menghasilkan gen resistensi terhadap antibiotik yang diberikan. Pemberian antibiotik yang kurang terkontrol saat penanganan kasus distokia, retensi plasenta, prolapsus uterus, dan gangguan ovarium sehingga akan menyebabkan bakteri akan memproduksi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).

Gen-gen ESBL yang diproduksi *Escherichia coli* dapat ditransmisikan pada hewan lain dalam populasi, manusia dan lingkungan melalui makanan yang terkontaminasi, lingkungan atau manusia yang kurang memperhatikan kebersihan. Kondisi usus, makanan dengan protein tinggi, dan lingkungan yang kurang bersih akan menyediakan kondisi ideal pada *Escherichia coli* yang menyandi gen ESBL untuk mengamplifikasi gen resisten.

Kasus kasus kawin berulang yang tinggi dan populasi sapi yang tinggi yang dipelihara oleh peternakan rakyat dengan manajemen sanitasi yang kurang memadai, apabila ditangani dengan antibiotik yang kurang terkontrol akan dapat menyebabkan penyebaran *Escherichia coli* yang menyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -*

*lactamase* (ESBL) pada hewan dan manusia dan lingkungan. *Escherichia coli* yang menyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) juga bisa berasal dari manusia yang kurang memperhatikan penggunaan antibiotik dalam pengobatan. Antibiotik pada hewan dan manusia pada dasarnya adalah sama, namun perbedaan dosis dan kepekaan individu yang berbeda. Robinson *et al.* (2016) menyatakan bahwa antibiotik yang digunakan dalam kesehatan manusia dan hewan sebagian besar terdiri dari molekul yang sama atau sangat mirip akan dapat menimbulkan gen resisten dan mendorong terjadinya transmisi resistensi antara hewan dan manusia, baik secara langsung maupun melalui lingkungan.

Gen penyandi ESBL akan dapat menyebar pada manusia dan lingkungan baik secara langsung atau tidak langsung karena *Escherichia coli* bisa dieksresikan dari saluran reproduksi dan dapat mengkontaminasi peternak dan lingkungan, maka gen resistensi mikroba akan disebarluaskan ke lingkungan dan mentransfer gen resisten pada bakteri lain. FAO (2016) menyatakan bahwa pemilihan antibiotik untuk pengobatan pada hewan belum tentu dapat mengatasi masalah *antimicrobial resistance* (AMR) karena gen resistensi dapat berpindah diantara bakteri, hospes, lingkungan dan dapat bermutasi secara spontan, sehingga fokus terhadap biosekuriti dan higien pangan menjadi penting dalam mereduksi penyebaran bakteri *Escherichia coli* yang menyandi gen resisten baik pada hewan, lingkungan dan manusia.

Berdasarkan tingginya kasus *repeat breeder* di Provinsi NTB, penggunaan antibiotik dalam penanganan kasus *repeat breeder* serta terdapatnya gen resisten yang diproduksi bakteri *Escherichia coli* yang dapat menyebar pada manusia dan

lingkungan, serta umumnya peternak rakyat di Pulau Lombok tidak memelihara sapi Bali saja, namun juga memelihara unggas dan hewan ternak lain dalam menopang perekonomian. Keadaan tersebut akan menyebabkan terjadinya interaksi dan berperan dalam transmisi *Escherichia coli* penyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL), maka perlu dilakukan penelitian pada peternakan rakyat sapi Bali di Pulau Lombok tentang *Escherichia coli* penyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang sampai saat ini masih dalam perdebatan tentang peran hewan produksi pada peternakan pada krisis *antimicrobial resistance* (AMR) global.

FAO (2016) menyatakan bahwa pemahaman yang lebih baik tentang epidemiologi munculnya dan penyebaran AMR dalam hewan produksi akan memberikan landasan penting untuk sukses strategi mengatasi masalah AMR. Perdebatan masih terjadi dalam pemahaman tentang mekanisme yang kompleks dalam munculnya AMR pada bakteri, dan interaksi yang terjadi di dalam ekosistem mikroba yang memungkinkan transfer resistensi antar bakteri.

Penelitian ini sebagai bukti penjelasan tentang AMR dengan *Escherichia coli* penyandi gen ESBL asal sapi Bali sebagai data dasar dalam menjelaskan kejadian AMR yang berimbas pada ketiga domain antara lain dari kesehatan manusia, hewan, dan lingkungan. Penelitian ini juga untuk membuktikan tentang terdapatnya *Escherichia coli* penyandi gen ESBL pada sapi Bali sebagai penanggulangan dan antisipasi penyebaran *Escherichia coli* dengan gen resisten terhadap antibiotik, mengingat bahwa *antimicrobial resistance* (AMR) telah menjadi masalah kesehatan global. World Health Organization (WHO) telah menyatakan bahwa AMR



menjadi satu dari 10 ancaman kesehatan global. AMR telah menyebabkan kematian sekitar 700.000 orang, dan pada 2050 jumlah ini diperkirakan meningkat menjadi sekitar 10 juta kematian setiap tahun (O'Neill, 2016).

Penelitian ini juga akan menjelaskan tentang koneksi *Escherichia coli* penyandi gen ESBL yang berasal dari sapi Bali sebagai hewan produksi yang berimbas pada kesehatan manusia dan lingkungan yang sampai saat ini masih dalam perdebatan. Chang *et al.* (2015) menyatakan bahwa peran hewan produksi, baik peternakan dan akuakultur pada krisis *antimicrobial resistance* (AMR) global masih diperdebatkan, dengan alasan bahwa kita tidak melihat begitu banyak hewan yang terkait infeksi pada manusia, sementara FAO (2016) menyatakan bahwa bahwa faktor yang paling signifikan dalam munculnya AMR adalah *antimicrobial use* (AMU) pada manusia dan juga pada hewan untuk pengobatan dan pencegahan penyakit.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah *Escherichia coli* dapat ditemukan dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*?
2. Apakah *Escherichia coli* yang diperoleh dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* resisten terhadap antibiotik melalui uji kepekaan terhadap antibiotik?
3. Bagaimana karakter gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*?

4. Bagaimanakah *Phylogenetic tree* gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* apabila dibandingkan dengan data di *GenBank*?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan umum**

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk membuktikan *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* resisten terhadap antibiotik, mempunyai gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang secara *phylogenetic tree* memiliki kedekatan dengan data yang ada di *GenBank*.

#### **1.3.2 Tujuan khusus**

1. Membuktikan *Escherichia coli* dapat ditemukan dalam cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*.
2. Membuktikan *Escherichia coli* yang diperoleh dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* resisten terhadap antibiotik.
3. Menganalisis karakter gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*.
4. Menganalisis *phylogenetic tree* gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari *Escherichia coli* yang berasal dari cairan

reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* apabila dibandingkan dengan data di *GenBank*.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat teoritis**

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai morfologi secara mikroskopis dan biokimia *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*.
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kepekaan *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* terhadap antibiotik sebagai skrining dalam memproduksi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).
3. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan tentang karakter gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang dihasilkan *Escherichia coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*.
4. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan penjelasan kekerabatan *Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dalam data *GenBank*.

### **1.4.2 Manfaat praktis**

1. Data tentang morfologi dan biokimia *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dapat dijadikan acuan dalam identifikasi *Escherichia coli* pada saluran reproduksi sapi Bali.

2. Data tentang kepekaan *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* terhadap antibiotik sebagai skrining dalam memproduksi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dapat dijadikan dasar tindakan pemberian antibiotik dan penentuan indikasi adanya *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).
3. Data tentang karakter gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi Sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dapat dijadikan acuan dalam deteksi gen resistensi pada sapi Bali.
4. Data tentang analisis *phylogenetic tree Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dalam data di *GenBank* diharapkan dapat menjelaskan asal *Escherichia coli* tersebut sehingga dapat dijadikan dasar dalam penanggulangan ancaman resistensi antimikroba dengan pendekatan *One Health* denganantisipasi penyebaran *Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).

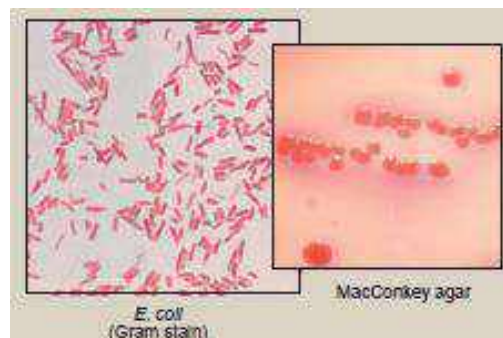
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* adalah bakteri flora normal usus besar pada manusia dan hewan. Nama bakteri ini diambil dari nama bakteriologis dari Jerman yaitu Theodor Von Escherich, yang berhasil melakukan isolasi bakteri ini pertamakali pada tahun 1885 dan membuktikan bahwa diare dan gastroenteritis yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* (Jawetz *et al.*, 1995). Klasifikasi nomenklatur *Escherichia coli* adalah sebagai berikut: Superdomain: *Phylogenetica*; Filum: *Proterobacteria*; Kelas: *Gamma Proteobacteria*; Ordo: *Enterobacteriales*; Family: *Enterobacteriaceae*; Genus: *Escherichia*; Species: *Escherichia coli* (Jawetz *et al.*, 1995).

*Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif, bersifat anaerob fakultatif dengan morfologi berbentuk batang pendek dengan panjang sekitar 2  $\mu\text{m}$ , diameter 0,7  $\mu\text{m}$ , lebar 0,4-0,7 $\mu\text{m}$ . Morfologi bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada **Gambar 2.1**



**Gambar 2.1.** Morfologi *Escherichia coli* pada MacConkey Agar (Cornelissen *et al.*, 2013)

*Escherichia coli* dapat diidentifikasi dengan pewarnaan gram, morfologi, fisiologis dan biokimia. *Escherichia coli* pada pewarnaan gram secara mikroskopis morfologinya berbentuk batang pendek, berwarna pink dengan sifat gram negatif. Gambaran koloni pada medium MacConkay agar dengan berwarna merah atau pink. *Escherichia coli* pada medium *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) berwarna hijau metalik berkilau seperti logam, sedangkan pada medium agar *bismuth sulfite* dan *brilliant green* tidak dapat tumbuh. *Escherichia coli* merupakan bakteri fakultatif anaerob.

*Escherichia coli* pada uji biokimia dapat memfermentasi glukosa, dapat menghasilkan energi dengan respirasi aerob atau anaerob, dan tidak memiliki sitokrom oksidase. Strain *Escherichia coli* sebagian besar dapat memfermentasi laktosa, berbeda dengan *Salmonella* dan *Shigella* yang tidak dapat memfermentasi laktosa. *Escherichia coli* menghasilkan asam dan gas selama fermentasi karbohidrat. *Escherichia coli* dalam uji *methyl red* dan *indole* menunjukkan hasil positif dan reaksi negatif untuk uji *Voges-Proskauer* dan sitrat. Hasil tes ini dapat dijadikan dasar dalam membedakan *Escherichia coli* dengan bakteri saluran pencernaan yang lain (Cornelissen *et al.*, 2013).

*Escherichia coli* mempunyai beberapa antigen antara lain yaitu: 1. Antigen O (somatik) yang bersifat tahan panas, terdiri dari lipopolisakarida yang mengandung glukosamin dan terdapat pada dinding sel; 2. Antigen H (flagel) yang bersifat tidak tahan panas (termolabil) dan rusak pada suhu 100 °C; 3. Antigen K (kapsul) atau *envelop antigen*, terdapat pada permukaan luar bakteri yang terdiri dari polisakarida

dan tidak tahan panas. Antigen K dibagi menjadi antigen L, A atau B berdasarkan pada ciri fisiknya yang berbeda-beda (Satish, 1990).

## **2.2 Extended Spectrum $\beta$ -Lactamases**

Antibiotika golongan  $\beta$ -lactam yang mempunyai komponen cincin  $\beta$ -lactam terdiri dari *Penicillin*, *Cephalosporin*, *Monobactam*, *Carbapenem*. Komponen cincin  $\beta$ -lactam bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri (Forbes *et al.*, 2007). Antibiotik golongan  $\beta$ -lactam umumnya bersifat bakterisid, dan sebagian besar efektif terhadap bakteri Gram positif dan negatif. Antibiotik golongan  $\beta$ -lactam berikatan dengan reseptor yang ada pada bakteri yaitu pada *penicillin-binding proteins* (PBPs), sehingga sintesis peptidoglikan dinding bakteri akan terhambat (Bush and Bradford, 2016).

*Extended spectrum beta-lactamase* adalah enzim diproduksi oleh bakteri gram negatif keluarga *Enterobacteriaceae* termasuk *Escherichia coli* dan mengalami peningkatan aktifitas dalam menghidrolisis antibiotika golongan  $\beta$ -lactam terutama pada *oxyimino-cephalosporins* (Bradford, 2001). *Extended spectrum beta-lactamase* (ESBL) adalah enzim yang mampu menghidrolisis antibiotika golongan  $\beta$ -lactam seperti *Penicillin*, *Cephalosporin* dan *Monobactam*. ESBL dapat menginduksi resistensi terhadap *Penicillin*, *Cephalosporin* generasi 1, 2, 3, dan *aztreonam* (kecuali cephamin dan karbapenem) (Paterson & Bonomo, 2005).

Enzim ini dapat menimbulkan resistensi bakteri Gram-negatif terhadap antibiotik golongan  $\beta$ -lactam dengan memutus ikatan nitrogen-karbonil dalam cincin  $\beta$ -lactam. *Extended betalactamases* yang dimediasi oleh plasmid mampu

menghidrolisis antibiotik golongan  $\beta$ -lactam meliputi *Penicillin*, *Oxyimino* seperti *Oxyimino-Cephalosporins* (*Ceftazidime*, *Cefotaxime*, dan *Ceftriaxone*) dan *Clavulanic Acid* secara inviro (Bush et al., 1995).

*Extended spectrum beta-lactamase* (ESBL) dapat diklasifikasi berdasarkan fungsinya dan molekular. Klasifikasi *Extended spectrum beta-lactamase* dikelompokkan berdasarkan fungsinya (*Bush-Jacoby-Mederos functional classification*) dan molekular (*Ambler molecular*). Klasifikasi *Beta-lactamase* secara molekular berdasarkan pada urutan asam amino dan nukleotidanya. Klasifikasi ini dibagi menjadi A, B, C dan D. Kelas A, C, dan D merupakan *serine-based mechanism* sedangkan kelas B atau *metallo beta-lactamase* membutuhkan ion *zinc* (Bradford, 2001; Lalitha, 2017).

Resistensi karena produksi enzim  $\beta$ -lactamase berkembang demikian pesat menjadi *Extended-Spectrum beta-lactamases* (ESBLs). Kemampuan bakteri penghasil ESBL menghidrolisis antibiotik  $\beta$ -lactam secara luas disebabkan oleh sejumlah mutasi pada beberapa gen seperti SHV, TEM, OXA dan sebagainya (Yuwono, 2011). Variasi gen resisten seperti blaCTX-M telah ditanyakan berhubungan dengan letak geografis (Hawkey & Jones, 2009).

Tipe gen ESBL memiliki variasi genotip antara lain tipe SHV, TEM, dan CTX-M, OXA, serta VEB. ESBL yang disandi gen TEM-1, TEM-2, SHV-1, CTX-M, dan OXA juga telah dilaporkan oleh para peneliti dari berbagai isolat dan region (Bradford, 2001; Drieue *et al.*, 2008; Lalitha, 2017). ESBL tipe TEM terdiri dari blaTEM-1 dan blaTEM-2. blaTEM-1 ditemukan pertama kali di Yunani pada tahun



1965 dari *Escherichia coli* yang diisolasi dari seorang pasien bernama Temoneira di Yunani, sehingga enzim tersebut disebut sebagai TEM (Guenther *et al.*, 2011).

### **2.3 Epidemiologi *Extended Spectrum $\beta$ -Lactamases (ESBL) Escherichia coli***

Gen penyandi *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) Escherichia coli* mengandung sejumlah mutasi yang memungkinkan untuk menghidrolisis spektrum antibiotik beta laktam secara luas. Sebagian besar ESBL adalah turunan enzim *Temoneira* (TEM) atau *Sulphydryl Variable* (SHV) (Bush *et al.*, 1995). ESBL tipe TEM dan SHV mempertahankan kemampuan mereka untuk menghidrolisis penisilin, mereka tidak secara katalitis seefisien enzim induknya (Bush and Singer, 1989).

Tipe gen penyandi *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Escherichia coli* pada sapi telah ditemukan diberbagai belahan dunia termasuk di Indonesia. Gen tipe CTX-M dan beberapa subtipe nya merupakan gen yang paling sering ditemukan telah dinyatakan berkaitan dengan letak geografis. Varian gen penyandi CTM-X dilaporkan telah terbagi dalam lima kluster antara lain gen CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, and CTX-M-25 (Yang *et al.*, 2018; Hassuna *et al.*, 2020).

CTX-M *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase* yang diproduksi *Escherichia coli* (CTX-M-1 dan CTX-M-9) telah ditemukan di Bogor Indonesia, sebesar 8.6% dari 220 sampel feses sapi pada rumah potong hewan di Bogor (Sudarwanto *et al.*, 2016). *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL tipe gen TEM dan CTX-M juga telah ditemukan pada feses sapi dan lingkungan di Peninsular Malaysia (Kamaruzzaman *et al.*, 2020).

*Escherichia coli* blaCTX-M-group-1 telah diisolasi pada sapi di Jerman dengan presentase 81 % dari 3 isolat, dan gen blaCTX-M-group-1, blaSHV, dan blaCMY juga dapat isolasi pada sapi (Wu *et al.*, 2013). Gen CTX-M *Escherichia coli* juga telah diisolasi dari feses sapi di peternakan yang berada di Inggris (Horton *et al.*, 2011).

*Escherichia coli* yang dapat membawa dua gen penyandi ESBL dengan tipe TEM dan CTX-M telah ditemukan pada sapi dipeternakan di Florida sebesar 50% dari 59 *Escherichia coli* positif membawa gen CTX-M dan TEM (Lee *et al.*, 2020). Kamaruzzaman *et al.* (2020) juga telah melaporkan terjadinya kombinasi gen ESBL *Escherichia coli* TEM dan CTX-M sebesar 8 dari 18 (44,4%) *Escherichia coli* yang berasal dari sapi dan lingkungan pada peternakan yang terletak di Selangor dan Negari Sembilan Malaysia.

## **2.4 Pemeriksaan *Extended Spectrum $\beta$ -Lactamases (ESBL) Escherichia coli***

### **2.4.1 Skring *Extended Spectrum $\beta$ -Lactamases (ESBL) Escherichia coli***

Sensitivitas skrining untuk ESBL pada bakteri enterik dapat bervariasi, tergantung pada agen antimikroba yang diuji. Uji Skring keberadaan *Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBL) Escherichia coli* telah di kembangkan oleh National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) dengan menggunakan skrining *broth microdilution* dan uji *disk diffusion* dengan menggunakan antibiotik yang mempunyai sensitivitas tinggi seperti *Cefpodoxime* dan *ceftazidime*. CDC (2010) menyatakan bahwa penggunaan lebih dari satu dari lima agen antimikroba yang disarankan untuk skrining akan memperbaiki sensitivitas deteksi, untuk deteksi ESBL *Cefpodoxime* dan *Ceftazidime*

menunjukkan sensitivitas tertinggi untuk deteksi ESBL *Escherichia coli* dianggap berpotensi sebagai produsen ESBL. Hasil uji skrining dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

**Tabel 2.1.** Hasil Uji Skrining Antibiotik ESBL *Escherichia coli*

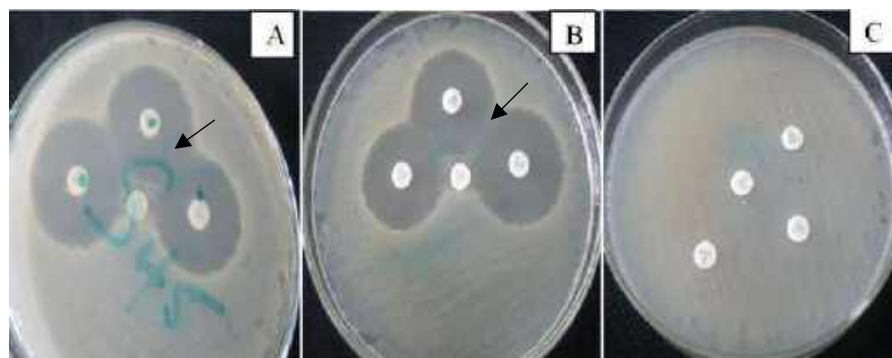
Disk Diffusion	<i>Minimum Inhibitory Concentration (MICS)</i>
<i>cefepodoxime</i> < 22 mm	<i>cefepodoxime</i> > 2 µg/mL
<i>ceftazidime</i> < 22 mm	<i>ceftazidime</i> > 2 µg/mL
<i>aztreonam</i> < 27 mm	<i>aztreonam</i> > 2 µg/mL
<i>cefotaxime</i> < 27 mm	<i>cefotaxime</i> > 2 µg/mL
<i>ceftriaxone</i> < 25 mm	<i>ceftriaxone</i> > 2 µg/mL

(CDC, 2010)

*National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* merekomendasikan untuk uji fenotip pada *Escherichia coli* yang berpotensi menghasilkan ESBL dapat menggunakan metode *broth microdilution* atau dengan *disk diffusion* dengan uji tunggal antibiotik *cefotaxime* dan *ceftazidime* yang dikombinasikan dengan asam klavulanat.

Hasil pengujian dengan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), penurunan > 3 pengenceran dua kali lipat dalam MIC untuk *cefotaxime* atau *ceftazidime* yang diuji kombinasi dengan asam klavulanat. Hasil *Minimum Inhibitory Concentration* dibandingkan saat diuji sendiri, untuk mengkonfirmasi bakteri penghasil ESBL.

Hasil pengujian dengan metode *disk diffusion*, kenaikan 5 mm dalam diameter zona untuk agen antimikroba yang diuji dengan asam klavulanat versus zonanya saat diuji sendiri mengkonfirmasi mikroorganisme tersebut penghasil ESBLs. Hasil pengujian dengan cakram difusi untuk *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL (**Gambar 2.2.**)



**Gambar 2.2.** Ekspresi ESBL *Escherichia coli* pada Difusi Cakram Ganda  
**Keterangan:** A dan B positif ekspresi ESBL (anak panah hitam);  
 C Negatif ekspresi ESBL (Igwe *et al.*, 2014).

#### 2.4.2 Uji Molekuler *Extended Spectrum $\beta$ -Lactamases (ESBL) E. coli*

Metode molekuler termudah dan paling umum digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBL)* yang termasuk dalam famili enzim adalah PCR (*Polymeration Chain Reaction*) dengan primer oligonukleotida yang spesifik untuk gen ESBL. Proses PCR untuk mengamplifikasi DNA membutuhkan DNA cetakan yang mengandung urutan DNA target yang akan diamplifikasi, sepasang primer, enzim DNA polimerase, buffer, dan campuran monomer nukleosida trifosfat (dNTP) (Abdullah & Debbie, 2003).

Primer yang digunakan dalam PCR biasanya dipilih untuk *annealing* ke daerah dimana berbagai mutasi titik tidak diketahui terjadi, namun PCR tidak akan membedakan varian TEM, CTX-M atau SHV yang berbeda. Beberapa metode molekuler yang akan membantu pendeteksian dan diferensiasi ESBL tanpa sekuensing telah disarankan (Bradford, 2001). PCR multipleks dengan primer gen yang mengkode ESBL seperti TEM, SHV, dan OXA telah dilakukan pada isolat asal feses manusia dengan belum memuaskan (Igwe *et al.*, 2014).

PCR dengan Primer tertentu untuk karakterisasi gen TEM, SHV, dan CTX-M (group 1, 2, 8, 9, atau 25) telah mendeteksi CTX-M yang diproduksi *Escherichia coli* dan bersifat multi drug resisten (Sudarwanto *et al.*, 2016).

### **2.5 Kejadian Repeat Breeder pada Sapi Bali di Nusa Tenggara Barat**

Sapi Bali adalah bangsa sapi potong lokal yang unggul dan banyak dipelihara oleh peternak di Pulau Lombok. Purwantara *et al.* (2012) menyatakan bahwa sapi Bali memiliki nilai ekonomis yang tinggi, tingkat kesuburan yang tinggi, kematian yang rendah, mudah beradaptasi dengan lingkungan serta mempunyai persentasi karkas yang tinggi. Berat hidup rata-rata sapi Bali saat lahir bisa mencapai 16,8 kg dan pada saat dewasa mencapai 303 kg (Talib *et al.*, 2003).

Gambar sapi Bali dapat dilihat pada **Gambar 2.3**



**Gambar 2.3.** Gambar Sapi Bali  
(Dokumentasi Pribadi)

Kejadian kasus gangguan reproduksi masih menjadi kendala dalam peternakan sapi Bali di Nusa Tenggara barat. Gangguan reproduksi yang sering terjadi pada sapi Bali di Nusa Tenggara Barat adalah kawing berulang (*repeat*

*breeder*). Kasus kejadian *repeat breeder* pada sapi Bali di Nusa Tenggara Barat telah dilaporkan sebesar 24,9% dari 2.127 kasus gangguan reproduksi (Dibia dkk., 2015).

*Repeat breeder* adalah sapi betina yang mempunyai siklus normal dan telah dikawinkan paling tidak tiga kali dengan pejantan atau semen pejantan fertil tetapi belum bunting tanpa disertai gejala klinis dari penyakit atau abnormalitas alat reproduksi. Sapi yang mengalami *repeat breeder* pada umumnya ditandai dengan *calving interval* yang panjang (18-24 bulan), angka konsepsi yang rendah (< 40%), dan *service per conception* yang tinggi (>3) (Rustamaji *et al.*, 2007).

Faktor - faktor yang diduga sebagai penyebab *repeat breeder* diantaranya adalah waktu perkawinan yang kurang tepat, kegagalan dalam mendeteksi birahi dan pengetahuan peternak yang rendah terhadap siklus birahi (*estrus*) pada sapi. Noakes *et al.* (2009) menyatakan bahwa perkawinan yang terlalu cepat atau perkawinan yang terlambat dapat menyebabkan kegagalan kebuntingan yang ditandai dengan kawin berulang. Juliana dkk. (2015) menyatakan bahwa peternak yang memelihara sapi Bali dan di Inseminasi Buatan (IB) oleh inseminator pendidikan sarjana, lama beternak 1,5 tahun, dan melakukan sanitasi dengan baik dapat menurunkan kasus *repeat breeder* sebesar 8,3995%.

*Repeat breeder* pada sapi juga dapat terjadi akibat adanya infeksi bakteri pada saluran reproduksi. Infeksi bakteri pada organ reproduksi sapi baik yang spesifik maupun yang non-spesifik dapat menyebabkan kegagalan kebuntingan pada sapi. Peningkatan sejumlah bakteri non-spesifik pada uterus dapat menyebabkan timbulnya kegagalan konsepsi (Joshi *et al.*, 2013). Rafika dkk. (2020) menyatakan bahwa *Escherichia coli* (30,00%), *Pseudomonas sp.* (30,00%),

*Enterobacter* sp. (20,00%), *Klebsiella* sp. (20,00%) telah ditemukan dari 10 isolat bakteri Gram negatif yang ditemukan pada sapi yang mengalami *Repeat breeder* di Aceh.

Penelitian pada sapi Bali di Lombok menyatakan bahwa 4 sampel yang berasal dari cairan uterus sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dinyatakan telah diidentifikasi adanya bakteri *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris* (Aminuddin *et al.*, 2020). Infeksi bakteri tersebut pada sapi Bali di Pulau Lombok akan bisa menyebabkan *repeat breeder* dan menyebabkan kerugian pada peternak, yang paling sering terjadi adalah pengulangan inseminasi, dan biaya pengobatan, apabila dalam pengobatan menggunakan antibiotik yang kurang terkontrol akan dapat menyebabkan resistensi bakteri.

## **2.6 Profil Peternakan di Pulau Lombok**

Provinsi Nusa Tenggara Barat (NTB) yang terdiri dari Pulau Lombok dan Pulau Sumbawa merupakan salah satu provinsi penyuplai sapi potong nasional. Data BPS Provinsi Nusa Tenggara Barat sampai tahun 2019 menyatakan bahwa jumlah populasi sapi di Nusa Tenggara Barat adalah 1. 234. 357 yang tersebar di 7 Kabupaten (Lombok Barat, Lombok Tengah, Lombok Timur, Sumbawa, Sumbawa Barat, Dompu) dan 2 Kota (Kota Mataram dan Kota Bima). Data tentang Jumlah sapi potong di NTB dari Tahun 2017-2019 dapat dilihat pada **Tabel 2.2**.

Kabupaten yang terletak di Pulau Lombok adalah Kabupaten Lombok Barat, Kabupaten Lombok Tengah, dan Kabupaten Lombok Timur. Kegiatan peternakan Kabupaten Lombok Barat berdasarkan Rencana Terpadu dan Program Investasi Infrastruktur Jangka Menengah (RPI2JM) Kabupaten Lombok Barat

Tahun 2015 – 2019 diarahkan untuk pengembangan komoditas sapi di Sekotong dan Lembar. Berdasarkan data BPS Kabupaten Lombok Barat, Populasi sapi mencapai 84.004 ekor yang tersebar pada seluruh kecamatan di Kabupaten Lombok Barat.

**Tabel 2.2.** Jumlah Populasi Sapi Potong di Nusa Tenggara Barat (2017-2019)

<b>Kabupaten/Kota</b>	<b>Populasi Sapi</b>		
	2017	2018	2019
<b>Kabupaten Lombok Barat</b>	106 640,00	113 358,00	119 185,00
<b>Kabupaten Lombok Tengah</b>	171 518,00	173 266,00	176 983,00
<b>Kabupaten Lombok Timur</b>	130 890,00	133 569,00	139 063,00
<b>Kabupaten Lombok Utara</b>	91 112,00	92 556,00	93 675,00
<b>Kapupaten Sumbawa</b>	246 506,00	247 702,00	257 294,00
<b>Kabupaten Sumbawa Barat</b>	65 383,00	68 218,00	75 872,00
<b>Kabupaten Dompu</b>	127 108,00	133 282,00	140 719,00
<b>Kota Mataram</b>	2 094,00	2 187,00	2 152,00
<b>Kota Bima</b>	21 702,00	23 511,00	24 692,00
<b>Nusa Tenggara Barat</b>	1 149 539,00	1 183 570,00	1 234 357,00

Sumber: BPS NTB (2020)

Pemeliharaan ternak sapi pada umumnya di Kabupaten Lombok Timur dilakukan dalam kandang kolektif dan sebagian besar telah dikembangkan menjadi kelompok tani-ternak. Pada tahun 2013 di Kabupaten Lombok Timur terdapat sekitar 504 kelompok tani ternak yang terdiri dari kelas pemula berjumlah 238



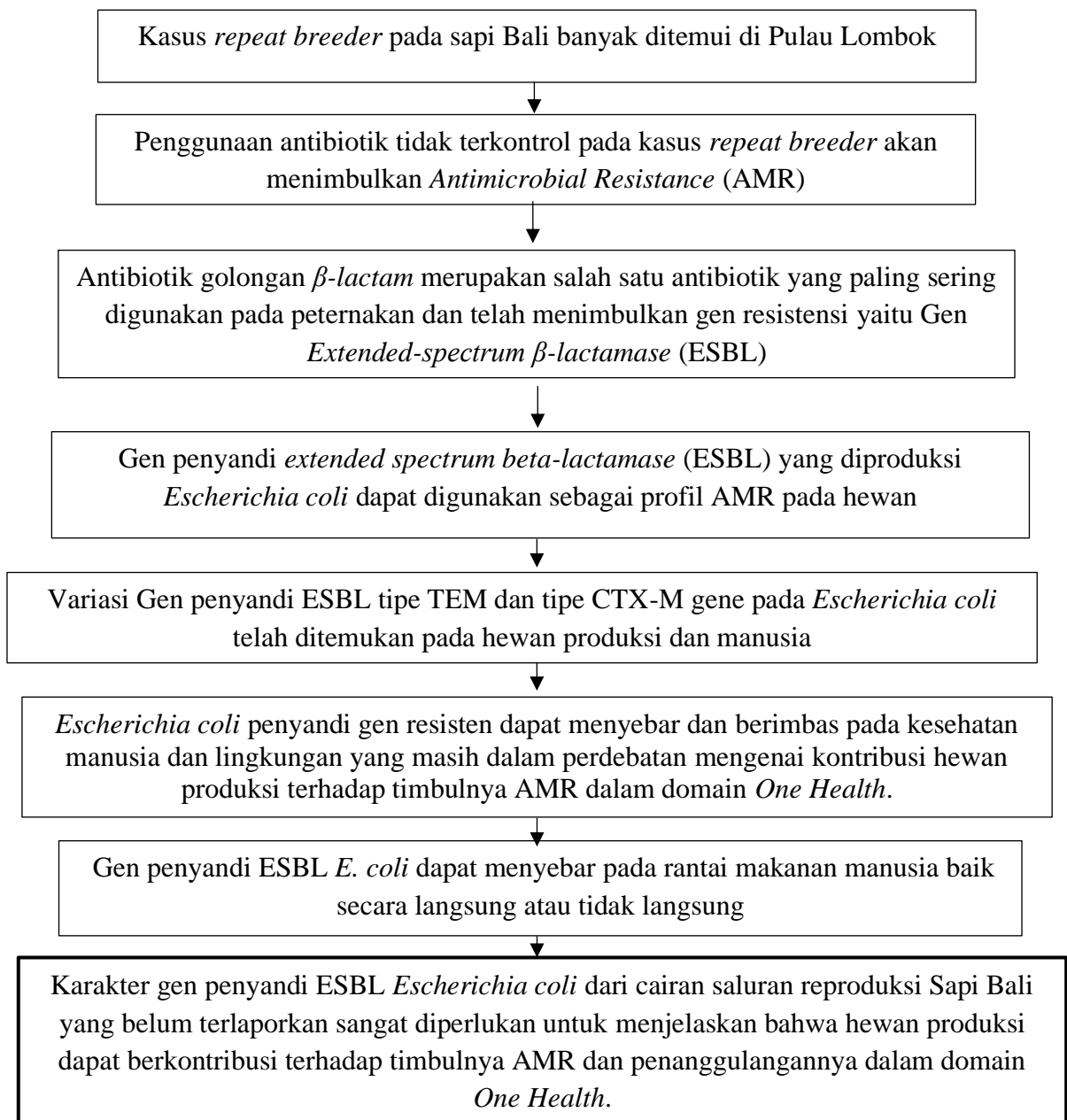
kelompok, kelas lanjut berjumlah 236 kelompok, dan kelas madya berjumlah 30 (Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi NTB, 2015).

Kabupaten Lombok Tengah merupakan salah satu sentra pengembangan ternak potong di Provinsi Nusa Tenggara Barat, Kecamatan Pringgarata merupakan salah satu wilayah kecamatan di wilayah Kabupaten Lombok Tengah yang telah mendapat berbagai bantuan program pengembangan ternak sapi potong dari pemerintah. Data Dinas Peternakan Kabupaten Lombok Tengah menunjukkan bahwa beberapa desa di wilayah kecamatan ini telah mendapatkan bantuan program pengembangan ternak sapi potong sejak tahun 1997. Program yang telah dilaksanakan di wilayah kecamatan tersebut diantaranya adalah program P2RT, program PPA, program PASP, program Penggemukan dan program PAP. Program-program tersebut mendapat pendanaan yang bersumber dari APBN maupun dari dana alokasi umum (DAU) yang melibatkan 13 Kelompok Ternak (Winarso, 2009).

## BAB III

### KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

→ = Jalur yang diteliti

□ = Variabel yang diteliti

## Penjelasan Kerangka Konseptual

Kasus kejadian *repeat breeder* pada sapi Bali di Nusa Tenggara Barat telah dilaporkan sebesar 24,9% dari 2.127 kasus gangguan reproduksi (Dibia dkk., 2015). Kejadian *repeat breeder* pada sapi dapat terjadi akibat adanya bakteri dalam saluran reproduksi. Joshi *et al.* (2013) menyatakan bahwa peningkatan sejumlah bakteri non-spesifik pada uterus dapat menyebabkan timbulnya kegagalan konsepsi. Kontaminasi bakteri pada saluran reproduksi dapat terjadi akibat penanganan kasus yang kurang higienis atau keadaan lingkungan yang kurang bersih sapi melahirkan atau pasca melahirkan.

Sheldon *et al.* (2008) menyatakan bahwa infeksi pada uterus bisa disebabkan oleh keadaan lingkungan saat melahirkan, namun retensi plasenta yang merupakan predisposisi paling penting. Arthur *et al.* (2001) menyatakan bahwa lingkungan yang kurang baik pasca partus akan memudahkan masuknya mikroba ke dalam lumen uterus, mencemari lingkungan pada lumen uterus, mengganggu kehidupan embrio yang dapat menyebabkan kematian embrio dini.

Penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol dalam penanganan kasus *repeat breeder* atau kawin berulang pada sapi Bali akan menyebabkan bakteri berusaha bertahan terhadap tekanan antibiotik sehingga menimbulkan gen resistensi yang akan menyebabkan bakteri resisten terhadap antibiotik yang diberikan. FAO (2016) menyatakan bahwa faktor yang paling signifikan dalam munculnya AMR adalah *antimicrobial use* (AMU) pada manusia dan juga pada hewan untuk pengobatan dan pencegahan penyakit.

Antibiotik golongan  $\beta$ -lactam merupakan salah satu antibiotik yang sering digunakan pada peternakan dan telah menimbulkan gen resistensi (Huang *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2019). Salah satu usaha bakteri untuk menghinari tekanan antibiotik golongan  $\beta$ -lactam adalah dengan jalan memproduksi enzim yang dapat menghidrolisis antibiotika golongan  $\beta$ -lactam yang disandi oleh gen *Extended Spectrum Beta-lactamase* (ESBL). Gen yang banyak dibicarakan adalah gen penyandi *Extended Spectrum Beta-lactamase* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli*. EFSA (2021) menyatakan bahwa profil AMR dari *Escherichia coli* hampir mencerminkan penggunaan antimikroba pada hewan untuk produksi.

Gen penyandi *Extended Spectrum Beta-lactamase* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli* seperti CTX-M dan TEM telah banyak ditemukan pada hewan dan manusia. *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL gen TEM dan CTX-M telah ditemukan pada feses sapi dan lingkungan di Peninsular Malaysia (Kamaruzzaman *et al.*, 2020). Gen penyandi ESBL CTX-M juga telah dinyatakan telah menyerang manusia (Widodo, *et al.*, 2020). Gen penyandi tersebut dapat ditransfer secara vertikal maupun horizontal. Transfer secara vertikal dapat terjadi pada keterunan bakteri saat berpropagasi, sedang secara horinsontal dapat terjadi pertukaran plasmid pembawa gen tersebut pada komunitas bakteri pada saluran reproduksi.

*Escherichia coli* penyandi gen resisten dapat menyebar dan berimbas pada kesehatan manusia dan lingkungan yang sampai saat ini masih dalam perdebatan tentang kontribusi hewan produksi terhadap timbulnya AMR dalam domain *One Health*. *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL dan berada saluran reproduksi sapi Bali saat tersekresi akan bisa menyebar pada hewan lain, manusia dan

lingkungan. Penyebaran *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL ke manusia dari sapi Bali dapat terjadi baik melalui konsumsi makanan asal hewan atau melalui kontak langsung dengan hewan yang terinfeksi serta mengkonsumsi produk pangan asal hewan yang terkontaminasi *Escherichia coli* yang memproduksi gen ESBL. *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL juga akan beradaptasi dengan antibiotik yang diberikan dan keadaan lingkungan sehingga menyebabkan akan mengalami mutasi dan menimbulkan varian genetik.

Kejadian *repeat breeder* pada sapi Bali di Nusa Tenggara yang cukup tinggi sangat memungkinkan untuk timbulnya gen penyandi ESBL yang diproduksi *Escherichia coli*, maka perlu dilakukan penelitian tentang gen penyandi ESBL yang diproduksi *Escherichia coli* dari sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* di Pulau Lombok yang sampai saat ini belum dilaporkan. Penelitian akan berguna dalam pengobatan *repeat breeder* dan dasar surveilans dalam menjelaskan bahwa sapi Bali sebagai hewan produksi pada peternakan rakyat dapat berkontribusi terhadap timbulnya AMR dalam domain *One Health*, sehingga dapat dijadikan rujukan dalamantisipasi penyebaran *Escherichia coli* penyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) pada manusia dan lingkungan, mengingat bahwa *antimicrobial resistance* (AMR) telah menjadi masalah kesehatan global.

## **BAB IV**

### **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan studi *cross sectional*. Studi yang dimaksud pada penelitian ini adalah studi obesrvasional deskriptif dengan pendekatan molekuler tentang gen penyadi ESBL *Escherichia coli* pada sapi Bali yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*) berdasarkan laporan inseminator. Sapi yang mengalami kasus *repeat breeder* dijadikan sampel dalam penelitian ini karena sapi telah mengalami pengobatan penggunaan antibiotik dalam penanganan kasus reproduksi.

#### **4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi pada penelitian ini adalah 51 ekor sapi Bali betina pada pada kandang kelompok ternak yang terletak di Kabupaten Lombok Tengah dan Lombok Timur yang bekerjasama denagan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Pendidikan Mandalika. Sampel cairan reproduksi diambil dari 22 ekor yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*) dari 51 sapi betina pada kelompok ternak berdasarkan laporan dari inseminator, alumni dan ketua kelompok ternak yang dikonfirmasi dengan palpasi rektal..

Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *purposive sampling* dengan kreteria telah di kawinkan atau di inseminasi 3 kali atau lebih tidak terjadi kebuntingan dengan siklus birahi normal dan telah mengalami pemberian antibiotik serta setelah dikonfirmasi dengan palpasi rektal tidak mengalami kelainan pada organ reproduksi. Kreteria tersebut berdasarkan definisi *repeat breeder* yang

menyatakan bahwa sapi betina yang mempunyai siklus dan periode birahi yang normal yang sudah dikawinkan 2 kali atau lebih dengan pejantan fertil atau diinseminasi dengan semen pejantan fertil tetapi tetap belum bunting (Wodaje dan Mekuria., 2016).

### 4.3 Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti pada penelitian ini adalah:

1. Identifikasi *Escherichia coli* yang berhasil diisolasi dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*
2. Kepekaan *Escherichia coli* hasil isolasi dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* terhadap antibiotik sebagai skrining *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL)
3. Karakter gen penyandi *Escherichia coli* penghasil ESBL (TEM, CTX-M dan VEB) dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*
4. *Phylogenetic tree Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dalam data di *GenBank*

### 4.4 Defisini Operasional Variabel Penelitian

Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Identifikasi *Escherichia coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* menggunakan pewanaan gram dengan sifat gram negatif dan tes biokimia, meliputi TSI, SIM dan uji gula-gula.

2. Kepekaan isolat *Escherichia coli* terhadap antibiotik dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami repeat breeder sebagai skrining *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dilihat dari zona hambat yang dihasilkan dengan metode difusi cakram (*disc diffusion method*) pada media MHA (Mueller Hinton Agar).
3. Karakter gen penyandi *Escherichia coli* penghasil ESBL (*bla* TEM, *bla*CTX-M, dan *Bla*VEB) dilakukan menggunakan metode PCR dengan elektroforesis agarosa 2% (b/v) dalam base pair (bp) (*bla* TEM 581 bp, *bla*CTX-M 579 bp, dan *Bla*VEB 568 bp)
4. *Phylogenetic tree Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dengan data di *GenBank* akan dianalisis menggunakan software Mega X dengan membandingkan dengan asal isolat dari hewan dan manusia yang terregister di NCBI.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat untuk pengambilan sampel antara lain adalah: berupa Botol sampel yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI), seperangkat alat Inseminasi Buatan, *plastic sheet*, *glove*, *colling box*, dan bunsen.

Alat untuk isolasi dan identifikasi dan uji resistensi bakteri *Escherichia coli* antara lain adalah: *Biosafety Cabinet Level 2*, *oose*, *bunsen*, *vortex*, tabung, cawan petri, erlen mayer, rak tabung, sentrifus, inkubator, mikroskop, *cotton swab*, *object* dan *cover glass*.



Bahan untuk uji resistensi adalah media *Mueller Hinton Agar* (MHA), disk antibiotik yang digunakan antara lain adalah disk antibiotik yang masing-masing berisi *Penicillin G* 10 U, *Oxytetracycline* 30 µg, *Gentamicin* 10 µg, dan *Tetracycline* 30 µg, serta *Cefotaxime* (CTX) 30 µg. *Cefotaxime* (CTX) 30 µg yang dikombonasi dengan 10 mg asam klavulanat untuk indikasi adanya ESBL dengan metode *double-disk approximation test* dengan kontrol isolat *Escherichia coli* ATCC 25922.

Bahan yang digunakan untuk isolasi dan kultur *Escherichia coli* antara lain pada adalah EMBA, Medium BHI, dan NaCl. Reagen untuk biokimia Uji antara lain reagen Kovac untuk produksi Indol (I), Reagen Uji *Citrate* (C) dan uji gula-gula yang terdiri dari Maltosa, Glukosa, laktosa dan Manitol.

Alat untuk ekstraksi DNA *Escherichia coli* antara lain adalah: *Laminar Cabinet Flow*, *QIAmp Mini Spin Column*, *Micropipet*, *blue* dan *yellow tip*, mikropipet, sentrifus, inkubator, *microsentrifuse minitube*, dan *Vortex*.

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA *Escherichia coli* antara lain adalah: sampel hasil kultur bakteri *Escherichia coli*, *buffer AL*, *buffer ATL*, *Qiagen Protease*, *buffer AW1*, *buffer AW2*, *Ethanol 96-100%* dan *buffer AE*.

Alat yang digunakan dalam Amplifikasi DNA dan PCR untuk identifikasi dan karakterisasi gen penyandi *Extended-spectrum β-lactamase* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli* antara lain adalah: *Laminar Cabinet Flow*, *Labcycler SensQuest®*, *Micropipet*, *Vortex*, *Microtube*, *Microtube* atau *PCR tube*, *Microtube rack* dan *White tips*.

Bahan yang digunakan dalam Amplifikasi DNA dan PCR untuk karakter gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli* antara lain adalah: Sampel DNA bakteri *Escherichia coli* hasil ekstraksi, PCR mix Dream Taq HS (*Thermo*®), ddH<sub>2</sub>O atau Nuclease Free Water (*Thermo*®), Primer VEB *forward* dan *reverse*, Primer CTX-M *forward* dan *reverse*, Primer TEM *forward* dan *reverse*.

#### 4.6 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada Bulan Maret sampai dengan Bulan Juni 2021. Lokasi pengambilan sampel cairan reproduksi dilakukan pada sapi Bali di kelompok ternak yang berada di desa yang termasuk dalam Kabupaten Lombok Tengah dan Kabupaten Lombok Timur dan mengalami *repeat breeder* berdasarkan laporan dari Inseminator, alumni dan ketua kelompok yang terletak di Kecamatan Kopang dan Kecamatan Terara.

Kecamatan Kopang dipilih berdasarkan dokumentasi peneliti dan tim bahwa *Escherichia coli* telah diisolasi dari sapi Bali betina yang mengalami gangguan reproduksi (Aminuddin *et al.*, 2020), sedangkan pemilihan Kecamatan Terara dipilih berdasarkan survei peneliti telah teridentifikasi sebanyak 8 ekor sapi Bali betina yang telah mengalami *repeat breeder* di Desa Lando.

Isolasi dan Identifikasi *Escherichia coli* dan uji resistensi antibiotik untuk konfirmasi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Masyarakat dan Kalibrasi Pulau Lombok.

Uji Karakterisasi gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) yang diproduksi dilakukan di Institut Biosain dan Rumah Sakit Hewan Pendidikan Universitas Brawijaya, Malang Jawa Timur.

## **4.7 Prosedur Penelitian**

### **4.7.1 Pengambilan sampel**

Pengambilan sampel cairan reproduksi pada sapi yang mengalami *repeat breeder* berdasarkan laporan peternak dan petugas IB serta konfirmasi pemeriksaan oleh peneliti. Pengambilan sampel dilakukan dengan steril menggunakan gun IB yang dilapisi *plastic sheet* yang dimasukkan dalam saluran reproduksi sapi Bali. Ujung *plastic sheet* dipotong sebesar 2-3 cm dan segera dimasukkan pada medium *enrichment BHIB (Brain Heart Infusion Broth)* dan dibawa menuju Balai Laboratorium Kesehatan Masyarakat dan Kalibrasi Pulau Lombok Provinsi Nusa Tenggara Barat menggunakan *cooling box*.

### **4.7.2 Kultur *Escherichia coli***

Sampel cairan reproduksi sapi Bali dalam medium *enrichment BHIB (Brain Heart Infusion Broth)* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37 °C. Sampel kemudian ditanam dalam *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)* dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh akan diwarnai dengan pewarnaan Gram dan diidentifikasi dengan uji biokimia dan dianalisis berdasarkan *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Holt *et al*, 1994).

### 4.7.3 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara mengambil sebanyak satu oose isolat bakteri dan diletakkan pada kaca obyek seluas  $\pm 1 \text{ cm}^2$  dan fiksasi. Isolat bakteri yang terfiksasi ditetesi zat warna kristal violet sebanyak 2 tetes dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air dan dikeringkan. Preparat tersebut kemudian ditetesi dengan larutan *lugol's iodine* dan diamkan selama 1 menit dan dikeringkan, kemudian dicuci dengan larutan peluntur (alkohol 96%) selama  $\pm 30$  detik, setelah itu dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Preparat setelah kering diberi larutan zat warna safranin selama 2 menit dan dicuci dengan air dan dikeringkan dan diamati dengan mikroskop, bakteri Gram positif tampak berwarna biru keunguan sedangkan Gram negatif berwarna merah (Vandepitte *et al.*, 2003)

### 4.7.4 Tes Biokimia

Tes biokimia dilakukan untuk mengidentifikasi *Escherichia coli*. Tes biokimia yang dilakukan antara lain adalah;

1. Medium TSI (*Triple sugar iron*)

Bakteri yang berhasil diisolasi diambil dari permukaan medium *Eosin Methylene Blue* (EMBA) kemudian ditanamkan ke dalam agar miring. *Escherichia coli* pada medium TSIA akan tampak asam-asam, tidak menghasilkan sulfur tetapi mampu menghasilkan gas (Holt *et al.*, 1994)

2. Medium *Sulfide Indole Motility* (SIM)

Bakteri yang berhasil diisolasi diambil dari permukaan medium *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) kemudian ditanamkan ke dalam agar miring (SIM). *Escherichia coli* pada medium tersebut tidak menghasilkan

sulfur, tidak ada motilitas, tetapi mampu membentuk cincin indol (Holt *et al.*, 1994)

### 3. Medium urea

Bakteri yang disolasi diambil dari permukaan medium *Eosin Methylene Blue* (EMBA) kemudian ditanamkan ke dalam agar miring medium urea. *Escherichia coli* pada medium ini mampu menghidrolisis urea dengan adanya enzim urease (Holt *et al.*, 1994).

### 4. Medium Sitrat

Bakteri hasil isolasi diambil dari permukaan medium *Eosin Methylene Blue* (EMBA) kemudian ditanamkan ke dalam agar miring medium sitrat. *Escherichia coli* pada medium ini tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Holt *et al.*, 1994).

### 5. Medium Glukosa

Bakteri hasil isolasi diambil dari permukaan medium *Eosin Methylene Blue* (EMBA), kemudian ditanamkan ke dalam agar miring medium glukosa. *Escherichia coli* pada medium ini dapat memfermentasi glukosa (Holt *et al.*, 1994).

### 6. Medium Fruktosa

Bakteri yang berhasil diisolasi diambil dari permukaan medium *Eosin Methylene Blue* (EMBA) ditanamkan ke dalam agar miring medium fruktosa. *Escherichia coli* pada medium ini dapat memfermentasi Fruktosa (Holt *et al.*, 1994).

## 7. Medium Maltosa

Bakteri yang berhasil diisolasi diambil dari permukaan medium *Eosin Methylene Blue* (EMBA) ditanamkan ke dalam agar miring maltosa. *Escherichia coli* pada medium ini dapat memfermentasi Maltosa (Holt *et al.*, 1994).

### 4.7.5 Uji Kepekaan Antibiotik

*Escherichia coli* yang diisolasi akan di uji kepekaannya pada 5 agen antimikroba yang sering diberikan di peternakan antara lain: *Penicilin* G 10 U, *Oxytetracycline* 30 µg, *Gentamicine* 10 µg, dan *Tetracycline* 30 µg serta ditambah dengan *Cefotaxime* (CTX) 30 µg sebagai indikasi ESBL dengan metode difusi disk Kirby Bauer. Antibiotik *Penicilin* dan *Cefotaxime* digunakan dalam penelitian ini karena antibiotik tersebut merupakan golongan antibiotik betalaktam, khusus untuk *Cefotaxime* merupakan antibiotik golongan golongan sefalosporin generasi ketiga yang digunakan sebagai indikasi adanya bakteri penghasil ESBL. *Oxytetracycline* yang merupakan golongan tetrasiklin digunakan dalam penelitian ini karena antibiotik tersebut telah digunakan pada pengobatan hewan besar baik berupa *short acting* atau *long acting*, *Tetracycline* digunakan dalam penelitian ini sebagai pembanding dari *Oxytetracycline* karena tetrasiklin biasa digunakan pada manusia. *Gentamicin* digunakan dalam penelitian ini karena *Gentamicin* telah digunakan untuk gangguan reproduksi seperti metritis yang dikombinasi dengan Prostaglandin F2 alfa (PGF2α) (Melia dkk., 2014).

Uji kepekaan *Escherichia coli* pada antibiotik dengan metode disk difusi dilakukan dengan mengambil koloni *Escherichia coli* pada EMBA kemudian

dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex untuk mencapai standar Mc Farland 0,5.

Suspensi *Escherichia coli* yang telah mencapai standar Mc Farland 0,5 kemudian di swab pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) secara merata dan didiamkan selama 5 menit kemudian ditanam 5 jenis antibiotik yang sering digunakan pada peternakan yaitu *Penicillin* 10 U, *Oxytetracycline* 30 µg, *Gentamicin* 10 µg, dan *Tetracycline* 30 µg serta *Cefotaxime* (CTX) 30 µg dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kepekaan terhadap antibiotik tersebut dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Penilaian sensitif (S), intermediet (I), dan resisten (R) ditentukan melalui ukuran zona hambat yang terbentuk berdasarkan standar *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014).

Uji tentang adanya ESBL *Escherichia coli* secara fenotif menggunakan metode *double-disk approximation test* menggunakan *Cefotaxime* (CTX) 30 µg dan *amoxicillin-clavulanate* (AMC) 30 µg untuk melihat sinergi dengan berdasarkan perluasan zona cakram *Cefotaxime* (CTX) di sekitar (*side facing*) cakram AMC. *Cefotaxime* (CTX) 30 µg diletakkan sekitar 30 mm dari *amoxicillin-clavulanate* (AMC) 30 µg pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang telah di swab dengan suspensi *Escherichia coli* yang telah mencapai standar Mc Farland 0,5. Perluasan zona cakram *Cefotaxime* di sekitar (*side facing*) cakram AMC diinterpretasikan sebagai hasil positif bakteri produsen ESBL. Konfirmasi adanya *Escherichia coli* yang memproduksi *Extended Spectrum Beta-lactamases* (ESBL) dengan PCR (Thomson *et al.*, 1992).

#### 4.7.6 Ekstraksi DNA *Escherichia coli*

Ekstraksi genom DNA *Escherichia coli* dilakukan dengan memasukkan 1,5 mL kultur *Escherichia coli* dalam 1,5 mL *tube microsentrifuse*, kemudian disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 7500 rpm. Volume pellet/konsentrat lalu tambah Buffer ATL sampai total volumenya 180  $\mu$ L, kemudian ditambah 20  $\mu$ L Proteinase K, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 560°C selama 1 jam lalu di vortex selama 15 menit dan disentrifus, kemudian ditambah 200  $\mu$ L Buffer AL ke dalam sampel kemudian divortex dan diinkubasi 700°C selama 10 menit lalu disentrifus, kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L ethanol (96-100%) ke dalam sampel kemudian divortex dan disentrifus. Hasil campuran sampel kemudian dimasukkan kedalam QIAmp *Spin Column* dan disentrifus selama 1 menit 8000 rpm kemudian diganti dengan *collection tube*.

Sampel dalam *collection tube* ditambhkan 500  $\mu$ l Buffer AW1 dan disentrifus selama 1 menit 8000 rpm kemudian diganti *collection tube*, lalu ditambahkan 500  $\mu$ L Buffer AW2 dan disentrifus selama 10 menit 8000 rpm kemudian diganti dengan *collection tube*, lalu disentrifus *full speed* selama 1 menit. Sampel diganti wadah ke 1,5  $\mu$ L *microsentrifuge tube* kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L Buffer AE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan disentrifus selama 1 menit 8000 rpm dan sampel DNA siap diamplifikasi.

Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* akan diukur secara kuantitatif untuk mengetahui konsentrasi dengan metode spektrofotometri. Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* juga dilakukan pemeriksaan secara kualitatif dengan



Elektroforesis agarosa 1%. Total DNA yang diekstraksi (200 ng setara dengan 5  $\mu$ L diukur dengan spektrofometer) (Kamaruzzaman *et al.*, 2020).

#### **4.7.7 PCR (*Polymeration Chain Reaction*) Gen penyandi ESBL**

PCR (*Polymeration Chain Reaction*) dilakukan untuk mengamplifikasi fragmen DNA yang diinginkan dengan menggunakan sepasang primer yaitu *primer forward* dan *reverse*. PCR dengan volume total 51  $\mu$ L terdiri PCR mix 25  $\mu$ L, 1,5  $\mu$ L primer, 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 3  $\mu$ L sampel DNA hasil ekstraksi. Campuran tersebut diproses dalam mesin PCR untuk mendeteksi gen *bla*TEM (*Temoneira*), *bla*CTX-M (*Cefotaxime-Munich*), dan *bla*VEB (*Vietnamese extended spectrum  $\beta$ -lactamase*) dengan menggunakan primer spesifik.

Penelitian ini menggunakan primer *Forward* dan *reverse* dari gen *bla*TEM, gen *bla*CTX-M dan gen *bla*VEB yang menjadi target gen *Extended Spectrum Beta-lactamases* (ESBL) yang diproduksi *Escherichia coli* berdasarkan referensi ESBL *Escherichia coli* di NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Primer gen *bla*TEM didesain berdasarkan referensi di NCBI dengan kode NG\_050238.1 yang merupakan *bla*TEM-206, primer untuk gen *bla*CTX-M didesain berdasarkan kode KX669628.1 yang merupakan *bla*CTX-M-14, sedangkan untuk gen *bla*VEB berdasarkan kode referensi JX679208.1 yang merupakan *bla*VEB-8 asal isolat manusia. Urutan Basa Nukleotida primer dan kode referensi di NCBI yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 3.1**.

**Tabel 3.1.** Urutan Basa Nukleotida Primer dan Referensi

<b>Primer Gen (ESBL)</b>	<b>Urutan Basa Nukleotida</b>	<b>NCBI Reference Sequence</b>
<b>blaTEM 206</b>	Primer F: TCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC	NG_050238.1
	Primer R: CAGTGCTGCAATGATACCGC	
<b>blaCTX-M- 14</b>	Primer F: CTTTATGCGCAGACGAGTGC	KX669628.1
	Primer R: CGTATTGCCTTTGAGCCACG	
<b>blaVEB-8</b>	Primer F: CATTTCCTCGATGCAAAGCGT	JX679208.1
	Primer R: TAGTGGCTGCTGCAATTCCA	

#### 4.7.8 Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil amplifikasi DNA dielektroforesis terhadap produk PCR pada gel agarose untuk mengetahui hasil amplifikasi. Gel agarose dibuat dengan 2gram bubuk agarosa dicampurkan ke dalam 100 mL TBE kemudian dimasak menggunakan *microwave* sampai larut, kemudian 10  $\mu$ L larutan ethium bromida (10 mg/mL) ditambahkan ke dalam gel agarosa yang masih cair dan dicampurkan hingga merata, kemudian gel agarosa dituang ke dalam cetakan gel yang telah disiapkan. Gel dibiarkan membeku, kemudian sisir diangkat sehingga terbentuklah sumur-sumur gel berkas sisir.

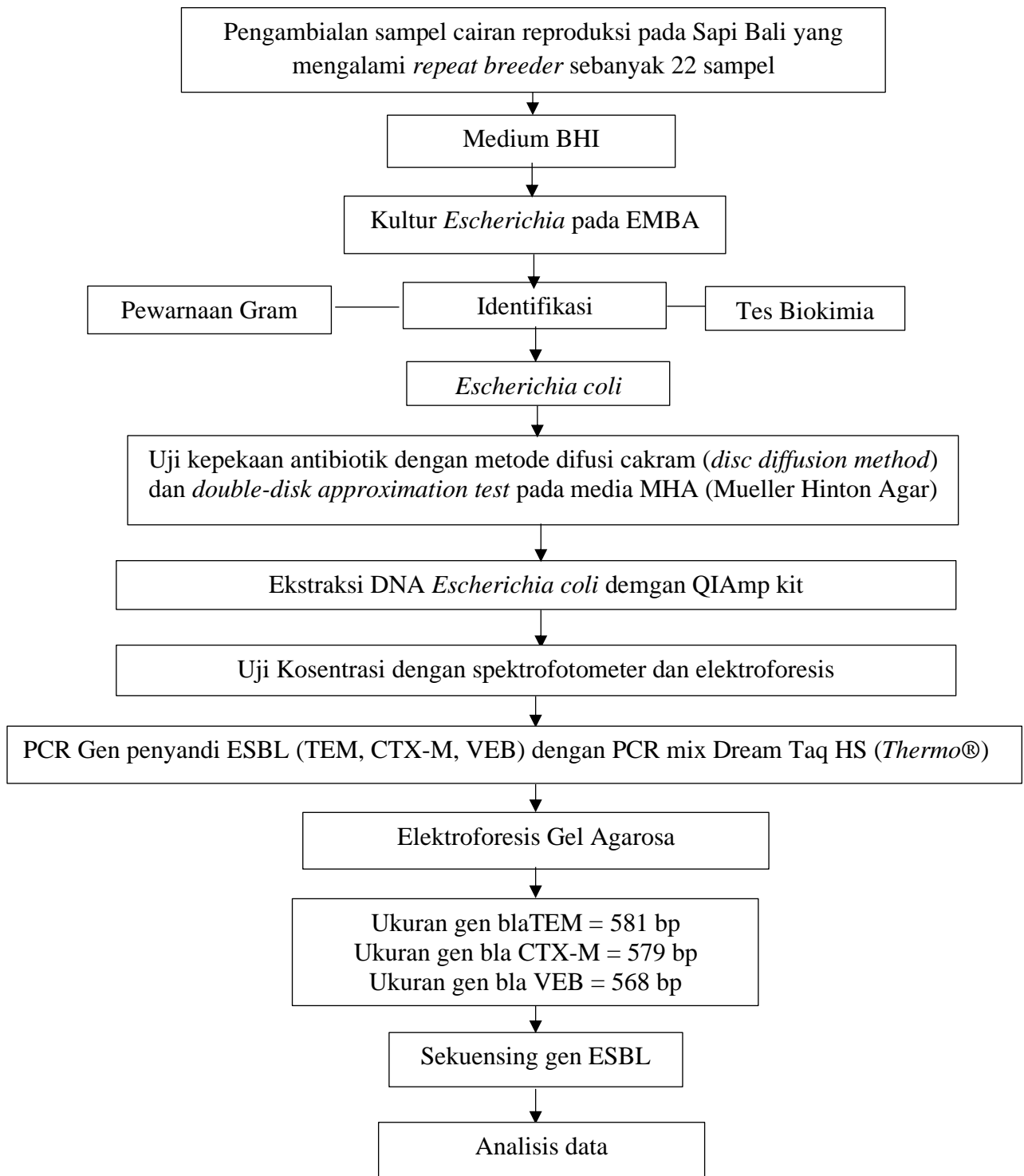
Gel agarosa yang telah dibikin dimasukkan *gel tray* pada alat elektroferesis berisi TBE Buffer, 1  $\mu$ L *GeneRuler* dimasukkan ke dalam sumuran, kemudian 5  $\mu$ L

masing-masing sampel DNA ke tiap sumuran selanjutnya setelah dicampur dengan larutan *loading dye*, kemudian proses elektroferesis dan ditunggu selama 35 menit. Gel elektroferesis di atas UV *Tray* dan dilakukan pembacaan menggunakan alat *Gel Imager* Biorad, setelah itu di simpan agar pada suhu 4°C untuk disekuensing. Sekuensing dilakukan di Genetika Science Indonesia

#### **4.8 Analisis data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan analisis secara deskriptif meliputi sekuens genomik hasil sekuensing Gen penyandi ESBL blaTEM, blaCTX-M dan dan gen blaVEB dari isolat *Escherichia coli*, serta dilakukan analisis *phyogenetic tree* untuk pengelompokan gen penyandi ESBL menggunakan algoritma software Mega X 10.

#### 4.9 Kerangka Operasional Penelitian



**Gambar 4.1. Kerangka Operasional Penelitian**

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Isolasi dan Identifikasi *Escherichia coli*

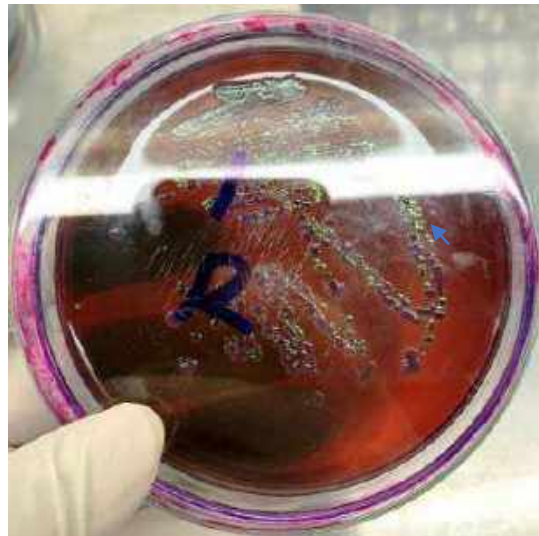
Pada Penelitian ini telah terkumpul 22 sampel cairan dari saluran reproduksi sapi Bali betina yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*) pada ketiga titik pengambilan sampel yaitu: 1. Desa Kopang Kabupaten Lombok Tengah sebanyak 8 sampel, 2. Desa Lando Kabupaten Lombok Timur sebanyak 8 sampel dan 3. Desa Pringga Jurang Kabupaten Lombok Timur sebanyak 6 sampel. Rekapitulasi sampel cairan dari saluran reproduksi sapi Bali betina yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*) dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

**Tabel 5.1.** Rekapitulasi Sampel Cairan Saluran Reproduksi Sapi Bali

Lokasi	Jumlah sampel	Jumlah Kultur Positif <i>E. coli</i> dan Kode Sampel	Jumlah PCR Positif <i>E. coli</i> dan Kode Sampel
1. Desa Kopang Kabupaten Lombok Tengah	8	3 (1R, 2R, 3R)	2 (1R, 2R)
2. Desa Lando Kabupaten Lombok Timur	8	2 (5R, 6R)	1 (5R)
3. Desa Pringga Jurang Kabupaten Lombok Timur	6	0	0
<b>Total</b>	22	5 (22,7%)	3 (1R, 2R) dan 5R (13,6%)

Seluruh sampel cairan dari saluran reproduksi sapi Bali betina yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*) yang berjumlah 22 pada Tabel 5.1 di kultur pada Media EMBA dan dilakukan identifikasi untuk keberadaan *Escherichia coli* dengan uji biokimia di Balai Laboratorium Kesehatan Masyarakat dan Kalibrasi Pulau Lombok Provinsi Nusa Tenggara Barat.

Hasil kultur pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) didapatkan 5 (22,7%) sampel yang menunjukkan ciri-ciri koloni *Escherichia coli* dari 22 sampel cairan reproduksi yang terkumpul. Hasil kultur bakteri yang menunjukkan ciri-ciri koloni dari *Escherichia coli* pada media EMBA dapat dilihat pada **Gambar 5.1**

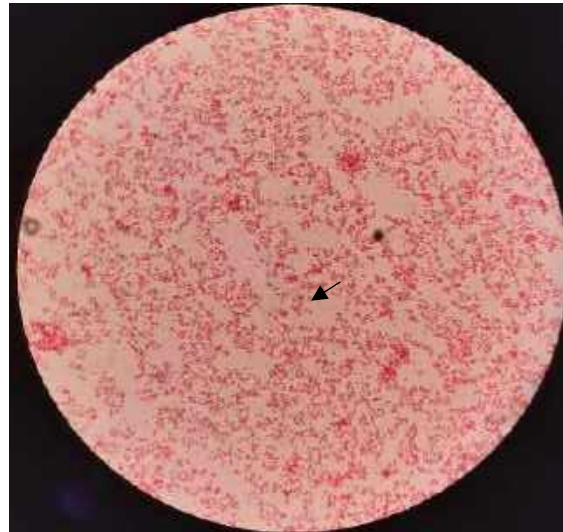


**Gambar 5.1.** Koloni *Escherichia coli* pada Media EMBA

**Keterangan:** Koloni *Escherichia coli* (anak panah biru)

Koloni *Escherichia coli* dalam media EMBA pada **Gambar 5.1** menunjukkan bahwa *Escherichia coli* yang tumbuh berwarna hijau metalik, bekilau dengan pusat warna gelap. Hasil kultur *Escherichia coli* pada media EMBA, kemudian warnai dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia untuk identifikasi

bakteri tersebut. Morfologi *Escherichia coli* pada pewarnaan Gram dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.



**Gambar 5.2.** Morfologi *Escherichia coli* dengan Pewarnaan Gram  
**Keterangan:** Morfologi *Escherichia coli* (anak panah hitam) 1000x

Hasil pengamatan secara mikroskopis dengan perbesaran 1000x pada **Gambar 5.2** menunjukkan bahwa *Escherichia coli* berwarna merah muda dan berbentuk batang pendek dan bersifat gram negatif. Lima *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang berhasil dikultur dari media Media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) kemudian dilakukan uji biokimia yang meliputi uji katalase dan oksidase serta uji gula-gula untuk identifikasi setelah dilakukan pewarnaan Gram.

Hasil uji katalase menunjukkan hasil positif, sedangkan untuk uji oksidase semua sampel negatif dari 5 sampel *Escherichia coli* yang dikultur. Hasil uji biokimia dari *Escherichia coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*) dapat dilihat pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2.** Hasil Uji Biokimia *Escherichia coli* dari Sapi Bali

Sampel	Urea	SIM	TSIA	Sukrose	Maltose	Simon sitrat	Glukose	Laktose	Manitol
Kontrol	+	+Indol	A/A + gas	-	+	-	+ gas	+	+
1 R	+	+indol	A/A +gas H <sub>2</sub> S	-	+	-	+	+	+
2 R	+	+Indol	A/A +gas	+	+	-	+ gas	+	+
3 R	+	+indol	A/A +gas	+	+	-	+	+	+
5 R	+	+indol	A/A +gas H <sub>2</sub> S	-	+	-	+	+	+
6 R	+	+indol	A/A +gas H <sub>2</sub> S	+	+	-	+	+	+

**Keterangan:** K= (*E. coli* ATCC 25922), 1R.2R.3R.5R.6R= Sampel *E. coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*); A=asam

Hasil uji biokimia pada **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa semua *Escherichia coli* yang berhasil diisolasi dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*) memiliki hasil tes *indole* positif dan tidak motil pada *Sulfide Indole Motility* (SIM). *Escherichia coli* pada penelitian ini memfermentasi gula (Maltosa, Glukosa, laktosa dan Manitol). *Escherichia coli* juga mampu menghidrolisis urea dengan adanya enzim urease. *Escherichia coli* pada penelitian ini plus minus menggunakan sitrat dalam memproduksi karbon.

## 5.2 Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik

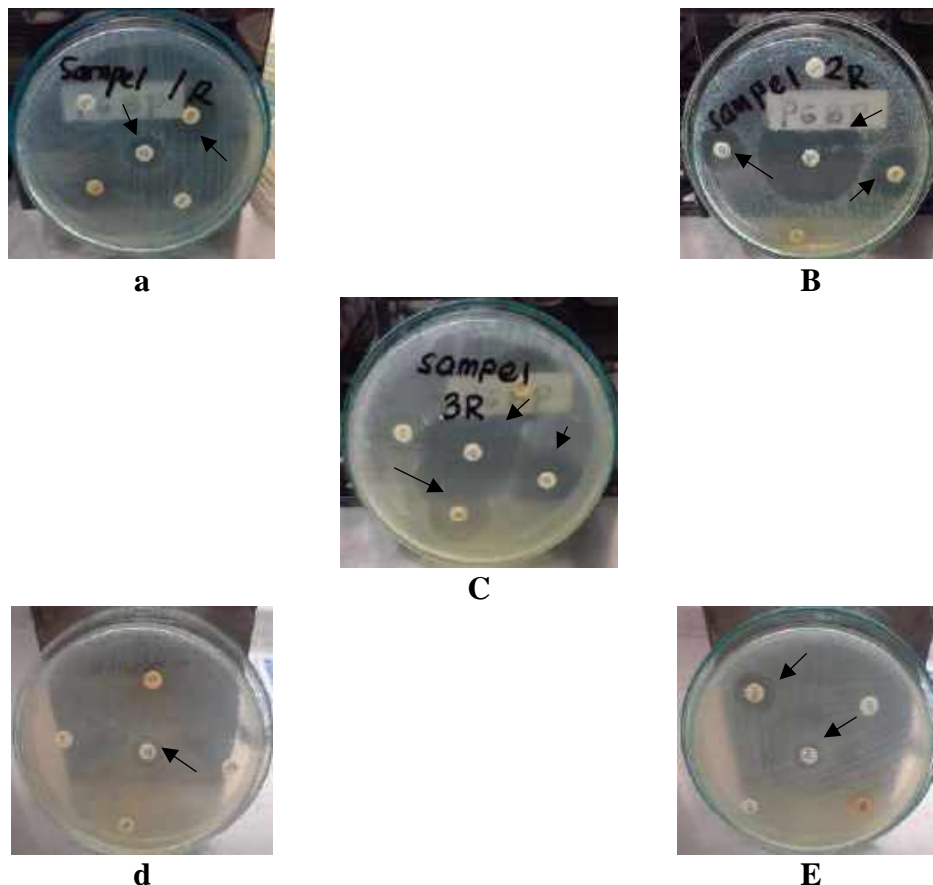
Hasil uji kepekaan antibiotik pada 5 antibiotik (Penisilin, Oksitetrasiklin, Tetrasiklin, Gentamisin, dan Cefotaksim). Penisilin dan Cefotaksim digunakan dalam penelitian ini sebagai antibiotik betalaktam, dimana Cefotaksim merupakan golongan Cephalosporin yang merupakan generasi ke-3 dari antibiotik



betalaktam. Oksitetrasiklin, Tetrasiklin dan Gentamisin merupakan antibiotik yang banyak digunakan pada peternakan.

Hasil uji kepekaan lima isolat bakteri *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang berhasil dikultur terhadap antibiotik yang sering digunakan pada peternakan yaitu *Penicillin* 10  $\mu$ g, *Oxytetracycline* 30  $\mu$ g, *Gentamicin* 10  $\mu$ g, dan *Tetracycline* 30  $\mu$ g serta ditambah dengan *Cefotaxime* (CTX) 30  $\mu$ g sebagai indikasi adanya ESBL menggunakan metode difusi cakram (*disc diffusion method*) pada media MHA (Mueller Hinton Agar) dapat dilihat pada

**Gambar 5.3.**



**Gambar 5.3.** Hasil Uji Kepekaan *Escherichia coli* Terhadap Antibiotik

**Keterangan:** a= sampel 1R, b= Sampel 2R, c= sampel 3R, d= Sampel 5R, e= Sampel 6R; ( ← ) = zona hambat

**Gambar 5.3** menyatakan bahwa seluruh sampel *Escherichia coli* tidak membentuk zona hambat terhadap antibiotik *Penicilin G* 10 U, sedangkan untuk *Oxytetracycline* 30 µg, *Gentamicine* 10 µg, dan *Tetracycline* 30 µg, serta *Cefotaxime* (CTX) 30 µg bervariasi. Diameter zona hambat yang terbentuk sebagai penilaian hasil uji resistensi berbagai antibiotik terhadap *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi secara detail ditampilkan pada **Tabel 5.3**.

**Tabel 5.3.** Zona Hambat Uji Kepekaan *Escherichia coli* Terhadap Antibiotik

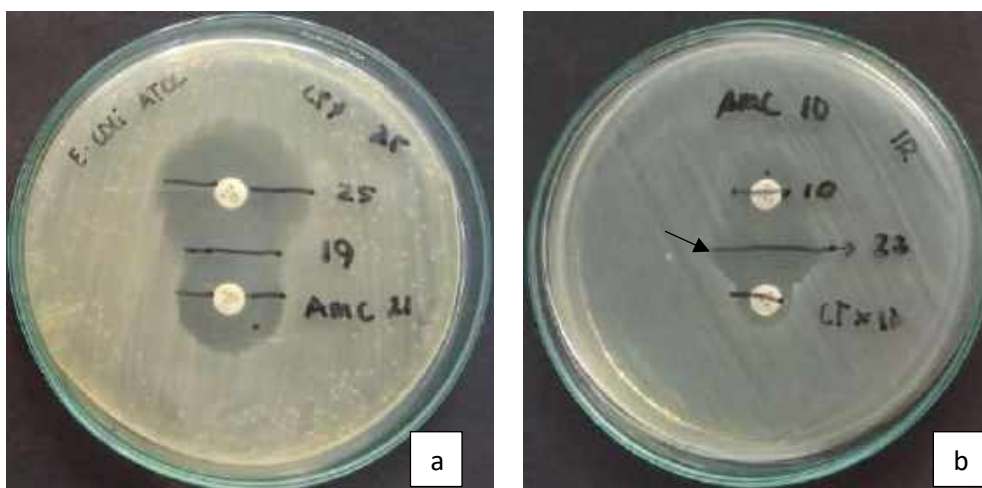
Antibiotik	Sampel 1 R (mm)	Sampel 2R (mm)	Sampel 3R (mm)	Sampel 5R (mm)	Sampel 6R (mm)
<i>Cefotaxime</i>	12 R	40 S	36 S	10 R	12 R
<i>Penicillin G</i>	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
<i>Oxytetracycline</i>	0 R	0 R	24 S	0 R	0 R
<i>Gentamicin</i>	0 R	18 S	0 R	0 R	0 R
<i>Tetracycline</i>	12 I	16 S	20 S	0 R	12 I

**Keterangan:** S=susceptible, I= Intermediate, R= Resistant

**Tabel 5.3** menunjukkan bahwa 5 (100%) *Escherichia coli* yang berhasil diisolasi tersebut resisten terhadap *Penicillin G* 10 U, 4 (80%) *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Oxytetracycline* 30 µg yaitu Sampel (1R, 2R, 5R dan 6R), 4 (80%) *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Gentamicin* 10 µg yaitu Sampel (1R, 3R, 5R dan 6R) dari 5 *Escherichia coli* yang berhasil diisolasi. Hasil penelitian menunjukkan hanya satu (20%) *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Tetracycline* 10 µg yaitu Sampel 5R, sedangkan untuk *Cefotaxime* (CTX) 30 µg terdapat 3 (60%) *Escherichia coli* yang resisten yaitu Sampel (1R, 5R, dan 6R) dari

5 *Escherichia coli* yang diisolasi dengan menghasilkan zona hambat 20 mm ( $\leq 21$  mm) sebagai indikasi menghasilkan ESBL.

Hasil uji adanya ESBL *Escherichia coli* dengan metode *double-disk approximation test* menggunakan Cefotaxime (CTX) 30  $\mu$ g dan Amoxicillin-Clavulanate (AMC) 30  $\mu$ g untuk melihat sinergi dengan berdasarkan perluasan zona cakram Cefotaxime (CTX) di sekitar (*side facing*) cakram AMC. (**Gambar 5.4.**)



Kontrol *Escherichia coli* ATCC 25922

Sampel *Escherichia coli* dari Saluran Reproduksi Sapi Bali

**Gambar 5.4.** Hasil Uji *Double-Disk Diffusion Escherichia coli*

**Keterangan:** a. *Escherichia coli* ATCC 25922; b. Sampel *Escherichia coli*; Amoxicillin-Clavulanate (AMC), Cefotaxime (CTX); Perluasan zona (anak panah hitam)

Hasil uji *Double-disk diffusion* pada **Gambar 5.4** menunjukkan bahwa Clavulanate dalam cakram Amoxicillin-Clavulanate (AMC) berdifusi pada agar dan menghambat  $\beta$ -laktamase di sekitar cakram Cefotaxime (CTX) dengan terjadi perluasan zona disekitar CTX. Perluasan zona cakram Cefotaxime di sekitar (*side facing*) cakram AMC diinterpretasikan sebagai hasil positif pada 3 sampel (1R, 6R, dan 5R). Hasil uji kepekaan terhadap antibiotik dan fenotip dengan *Double-disk diffusion* pada *Escherichia coli* dilanjutkan dengan uji PCR dan sekuensing untuk memastikan adanya gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) Escherichia coli*.

Uji PCR untuk memastikan adanya gen penyandi ESBL didahului dengan ekstraksi DNA *Escherichia coli* untuk mengetahui konsentrasinya. Uji konsentasi hasil ekstaksi DNA *Escherichia coli* dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif untuk memastikan keberadaan *Escherichia coli*.

### 5.3 Ekstraksi DNA *Escherichia coli*

Ekstraksi DNA (*deoxyribonucleic acid*) *Escherichia coli* pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan QIAmp Mini Spin Column DNA kit. Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* secara kualitatif dan kuantitatif untuk memastikan keberadaan *Escherichia coli*. Hasil ekstraksi secara kuantitatif diukur menggunakan metode spektrofotometri yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi yang terdapat pada hasil ekstraksi dan untuk mengetahui apakah adanya kontaminan yang terdapat pada hasil ekstraksi DNA. Pengukuran dilakukan dengan mesin Nano-200 Micro-asam nukleat spektrofotometer dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 230 nm, 260 nm dan 280 nm. Hasil pengukuran ekstraksi DNA pada 5 sampel kultur *Escherichia coli* (1R, 2R, 3R, 5R, 6R) dan satu sampel kontrol *Escherichia coli* ATCC 25922 (K) dapat dilihat pada **Tabel 5.4**

**Tabel 5.4.** Konsentrasi dan Kemurnian Ekstraksi DNA *Escherichia coli*

Kode Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (nm) (260/230)	Kemurnian (nm) (260/280)
1R	58,18	1,79	2,04
2R	68,43	1,84	1,81
3R	101,18	1,88	1,98
5R	34,51	0,83	1,60
6R	62,38	1,82	1,85
K	74,34	1,83	1,98

**Keterangan:** K= Kontrol *E. coli* ATCC 25922; 1R,2R,3R,5R,6R= Sampel *Escherichia coli*

Hasil analisis kemurnian ekstraksi DNA *Escherichia coli* dengan konsentrasi 34,51 ng/ $\mu$ L -101,18 ng/ $\mu$ L pengukuran spektrofotometer berdasarkan

rasio absorbansi  $\lambda=260$  nm terhadap nilai absorbansi  $\lambda=280$  nm berada diantara 1,60-2,4, sedangkan berdasarkan rasio absorbansi  $\lambda=230$  nm terhadap nilai absorbansi  $\lambda=260$  berada diantara 0,83-1,88. Sampel hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* menunjukkan DNA murni tanpa kontaminasi protein atau RNA adalah kode sampel 2R, 3R, 5R, 6R, dan EA (kontrol *Escherichia coli* ATCC 25922) dengan nilai absorbaansi kemurnian yaitu (1,81, 1,98, 1,60, 1,85, 198). DNA hasil dari isolasi tersebut selanjutnya digunakan untuk proses amplifikasi gen blaTEM 581 bp, blaCTX-M 579 bp, dan blaVEB 568 bp dengan teknik PCR.

Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* secara kualitatif dengan Elektroforesis agarosa 1% (b/v) selama 35 menit dengan voltase 220 V. Hasil Elektroforesis agarosa 1% dapat dilihat pada **Gambar 5.5**



**Gambar 5.5.** Hasil Elektroforesis Ekstraksi DNA *Escherichia coli*  
**Keterangan:** (M= marker (kb), 1-5 = Sampel, 6= *E. coli* ATCC 25922)

Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* secara kualitatif dengan Elektroforesis agarosa menunjukkan bahwa DNA *Escherichia coli* untuk semua sampel pada 9 kilobase pair (kb) atau 9000 pasang basa.

#### 5.4 PCR gen TEM, CTX-M dan VEB *Escherichia coli*

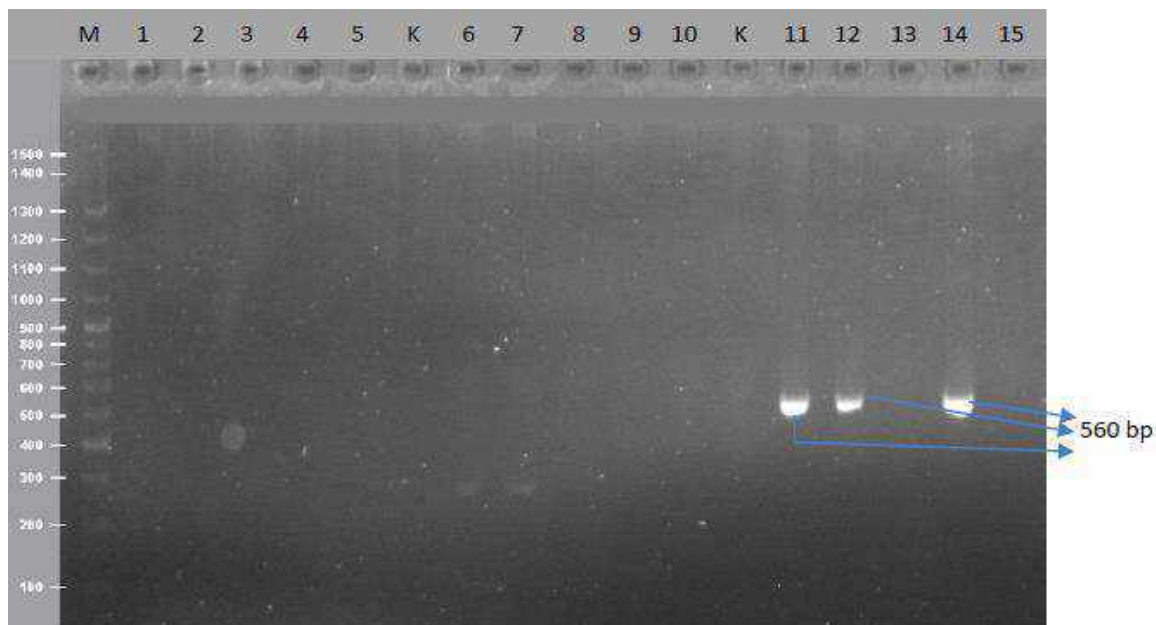
Penggandaan (amplifikasi) DNA (*deoxyribonucleic acid*) *Escherichia coli* dilakukan menggunakan metode PCR (Polymerase Chain Reaction). Proses PCR untuk mengamplifikasi DNA membutuhkan DNA cetakan yang mengandung urutan DNA target yang akan diamplifikasi, sepasang primer, enzim DNA polimerase, buffer, dan campuran monomer nukleosida trifosfat (dNTP) (Abdullah & Debbie, 2003). Proses PCR untuk amplifikasi menggunakan desain primer yang dirancang sendiri secara *in silico*.

Data sekuen gen penyadi ESBL blaTEM (*Temoneira*), blaCTX-M (*Cefotaxime- Munich*), dan blaVEB (*Vietnamese extended spectrum  $\beta$ -lactamase*) yang digunakan diperoleh dari database The National Center for Biotechnology Information (NCBI) pada laman URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Data sekuen, urutan basa, dan ukuran amplicon primer serta referensi dasar pembuatan primer pada NCBI yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 5.5**.

**Tabel 5.5.** Data Primer Gen Target ESBL *Escherichia coli*

Primer – Gen Resisten	Amplikon size (ukuran bp)	Urutan Basa Nuceotida	NCBI Reference Sequence
<i>bla-TEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase</i> <b>TEM-206</b>	581	Primer F: TCCTTGAGAGTTTTCGCCCC Primer R: CAGTGCTGCAATGATACCGC	NG_050238.1
<i>EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14</i>	579	Primer F: CTTTATGCGCAGACGAGTGC Primer R: CGTATTGCCTTTGAGCCACG	KX669628.1
<i>MLI extended-spectrum beta-lactamase VEB-8 gene</i>	568	Primer F: CATTTCCTGATGCAAAGCGT Primer R: TAGTGGCTGCTGCAATTCCA	JX679208.1

Program amplifikasi dengan PCR yang digunakan sebagai berikut: Suhu pre-Denaturasi 95°C selama 3 menit, suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 57°C selama 30 detik, *elongasi* 72°C selama 1 menit, lalu *post-elongasi* 72°C selama 5 menit. Dengan siklus 35 kali. Amplikon hasil PCR dielektroforesis kemudian visualisasi pada *geldoc* (Biorad system, USA). Hasil hasil dari elektroforesis agarosa 2% dari produk PCR gen TEM, CTX-M dan VEB yang dilakukan secara berulang – ulang dapat dilihat pada **Gambar (5.6, 5.7, 5.8 dan 5.9)**

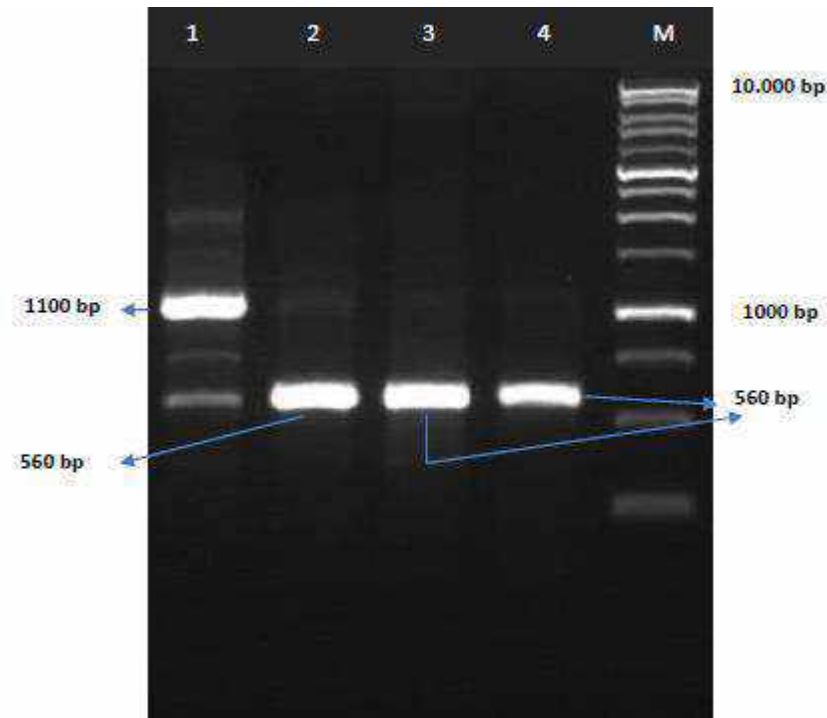


**Gambar 5.6.** Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaVEB, blaTEM, blaCTX-M *E. coli* dengan PCR

**Keterangan:** M: Marker; (1,2,3,4,5): Sampel untuk gen VEB; (6,7,8,9,10): Sampel untuk gen CTX-M; (11.12.13.14, dan 15): Sampel untuk gen TEM; K: Kontrol *E. coli* ATCC 25922

**Gambar 5.6** menunjukkan bahwa sampel untuk gen VEB yaitu no (1,2,3,4,5) tidak ada yang positif, sedangkan sampel (6,7,8,9,10) untuk gen CTX-M juga tidak tampak yang positif. Sampel (11.12.13.14, dan 15) untuk gen TEM menunjukkan 3 yang positif yaitu sampel no 11, 12 dan 14 dengan kode 1R, 2R, dan 5R pada posisi 560 bp

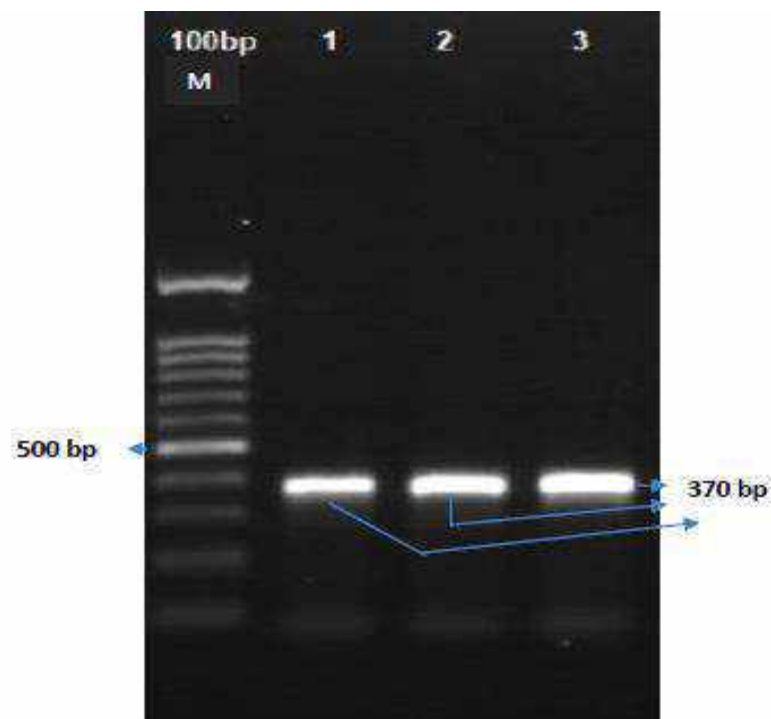




**Gambar 5.7.** Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaTEM *E. coli* dengan PCR

**Keterangan:** M: Marker; 1-3: Sampel (1R,2R, dan 5R) dan no. 4 Sampel ulangan dari 5R

**Gambar 5.7** menunjukkan bahwa untuk gen blaTEM (*Temoneira*), menunjukkan 3 yang positif yaitu sampel no 1, 2,3, dan 4. Sampel 4 merupakan pengulangan dari sampel 3, kode masing-masing sampel adalah 1R, 2R, dan 5R. Sampel no. 1 (1R) pada band agarose elektroforesis berada pada posisi 1100 bp (basepair), sampel no. 2 (2R), pada posisi 560 bp, begitu pula untuk sampel no.3 dan 4 (R5) berda pada posisi 560 bp.

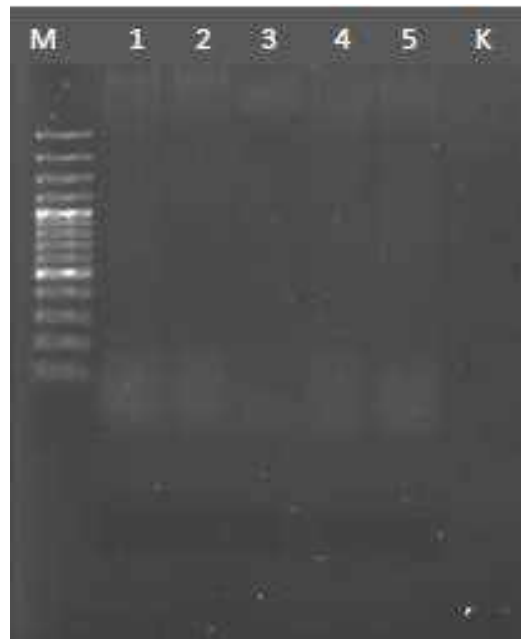


**Gambar 5.8.** Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaCTX-M *E. coli* dengan PCR.

**Keterangan:** M: Marker; 1-3: Sampel (1R,2R, dan 5R)

**Gambar 5.8** menunjukkan bahwa untuk gen blaCTX-M (*Cefotaxime-Munich*) menunjukkan 3 sampel yang positif yaitu sampel no 1,2 dan 3 dengan kode sampel 1R. 2R dan 5R dengan pada posisi 370 bp pada band agarose elektroforesis untuk masing-masing sampel.

Penelitian ini juga melakukan PCR ulangan pada gen VEB yaitu blaVEB-8 amplicon sebesar 581bp sebagai konfirmasi dalam identifikasi gen yang pada manusia karena gen TEM dan CTX-M pada umumnya ditemukan pada hewan. Hasil elektroforesis agarose 2% dari produk PCR gen VEB dapat dilihat pada **Gambar 5.9.**



**Gambar 5.9.** Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen blaVEB pada  
**Keterangan:** M: Marker; 1 – 5: Sampel; K: *E. coli* ATCC 25922

Gambar 5.9 menunjukkan bahwa dari seluruh sampel yang diuji dengan nomer (1,2,3,4,5) dan kontrol *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan negatif untuk blaVEB (*Vietnamese extended spectrum  $\beta$ -lactamase*)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan menggunakan primer blaTEM dengan referensi (bla-TEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206) diperoleh hasil 3 sampel yang positif dari 5 sampel positif menghasilkan gen TEM yaitu sampel 1R, 2R, dan 5R, sementara dengan menggunakan primer blaCTX-M (EC271 *Extended Spectrum Beta-lactamase* CTX-M-14) diperoleh hasil 3 sampel positif mengandung gen CTX-M yaitu Sampel 1R dan 2R, dan 5R sedangkan dengan menggunakan primer blaVEB (MLI *Extended-Spectrum Beta-lactamase* VEB-8 gene) tidak ada sampel yang positif yang ditunjukkan pada **Gambar 5.9.**

Tiga sampel yang positif dengan kode 1R, 2R dan 5R kemudian disekuensing untuk mengetahui urutan nuleotidanya, Hasil data sekuensing yang

telah ditata untuk gen TEM dari *Escherichia coli* penghasil ESBL pada masing-masing sampel adalah sebagai berikut:

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10      20      30      40      50
1R-T_TEM -GATTAAGT TGTGCTATGT GCGGGGTAT TATCCCGTAT TGAGGCCGGG
2R-T_TEM CGTTTTAAGT TGTGCTATGT GCGGGGTAT TATCCCGTAT TGAGGCCGGG
5R-T_TEM ATTTTAAAGT TGTGCTATGT GGTGGGTAT TATCCCGTAT TGAGGCCGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60      70      80      90     100
1R-T_TEM CAGAGCAAC TCGGTGGCGG CATACTAT TCTCAGAATG ACTTGGTTGA
2R-T_TEM CAGAGCAAC TCGGTGGCGG CATACTAT TCTCAGAATG ACTTGGTTGA
5R-T_TEM CAGAGCAAC TCGGTGGCGG CATACTAT TCTCAGAATG ACTTGGTTGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110     120     130     140     150
1R-T_TEM GTACTCACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG
2R-T_TEM GTACTCACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG
5R-T_TEM GTACTCACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160     170     180     190     200
1R-T_TEM AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC GCCCAACTTA
2R-T_TEM AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC TGCCAACTTA
5R-T_TEM AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC TGCCAACTTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210     220     230     240     250
1R-T_TEM CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA
2R-T_TEM CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA
5R-T_TEM CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260     270     280     290     300
1R-T_TEM CATGGGGGAT CATGTAACTC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG
2R-T_TEM CATGGGGGAT CATGTAACTC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG
5R-T_TEM CATGGGGGAT CATGTAACTC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310     320     330     340     350
1R-T_TEM AAGCCATACC AAACCACGAG CGTGACACCA CGATCCCTGC AGCAATGGCA
2R-T_TEM AAGCCATACC AAACCACGAG CGTGACACCA CGATCCCTGC AGCAATGGCA
5R-T_TEM AAGCCATACC AAACCACGAG CGTGACACCA CGATCCCTGC AGCAATGGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360     370     380     390     400
1R-T_TEM ACAACGTTGC GCAAACCTATT AACTGGTGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG
2R-T_TEM ACAACGTTGC GCAAACCTATT AACTGGTGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG
5R-T_TEM ACAACGTTGC GCAAACCTATT AACTGGTGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410     420     430     440     450
1R-T_TEM GTAA-----
2R-T_TEM GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC
5R-T_TEM GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460     470     480     490     500
1R-T_TEM TGGCTCGGC CCTTCGGGT GGTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC
2R-T_TEM TGGCTCGGC CCTTCGGGT GGTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC
5R-T_TEM TGGCTCGGC CCTTCGGGT GGTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510     520     530     540
1R-T_TEM GGTGAGCGTG GGTCTCGGG TATCATTGCA GCACTGAGSA
2R-T_TEM GGTGAGCGTG GGTCTCGGG TATCATTGCA GCACTGAGSA
5R-T_TEM GGTGAGCGTG GGTCTCGGG TATCATTGCA GCACTGAGSA

```

Hasil sekuensing pada masing-masing sampel kemudian disejajarkan (*alignment*) dengan *Escherichia coli* referensi dengan kode NG\_050238.1 pada data *GenBank* NCBI menggunakan software Mega X. Hasil *alignment Escherichia coli* penyadi gen TEM apabila dibandingkan referensi dengan kode NG\_050238.1 di NCBI.

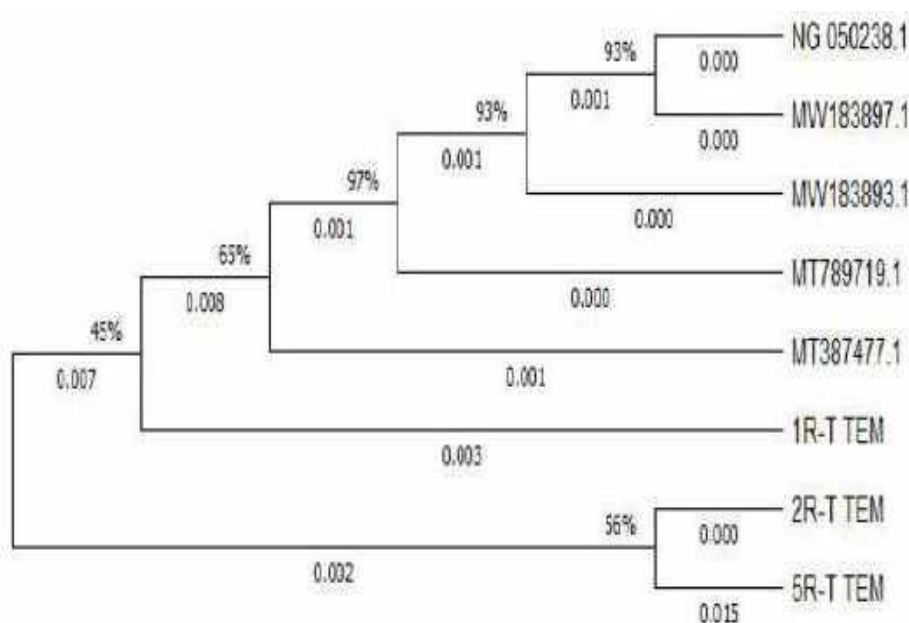
Sampel mengalami R1 mengalami transisi sekitar 19 nukleotida yaitu pada (c.375, 403, 408, 417; **A>G**), (c.244, 370, 388, 400, 435; **G>A**), (c.368, 378, 398, 444, 548, 585, 610; **C>T**) dan (c.228, 369, 399; **T>C**). Sampel mengalami R1 mengalami transversasi sekitar 29 nukleotida yaitu pada (c.379, 433, 441, 442, 552; **A>T**), (c.389, 391; **A>C**), (c.367, 425, 523; **G>C**), (c.414, 427; **G>T**), (c.208, 396, 406, 407, 410, 440, 447; **T>A**), (c.207, 448; **T>G**), (c.372, 402, 405, 431, 439, 443; **C>A**), dan (c.371, 423; **C>G**). Sampel mengalami R1 mengalami insersi sekitar 3 nukleotida yaitu pada (c.380, 381; **->G**) dan (c.382; **->T**).

Sampel mengalami R2 mengalami transisi sekitar sekitar 2 nukleotida yaitu pada (c.745; **G>A**) dan (c.228; **T>C**). Sampel mengalami R2 mengalami transversasi sekitar sekitar 3 nukleotida yaitu pada (c.211; **A>T**), (c.207; **T>G**), dan (c.748; **C>A**) dan tidak dijumpai adanya insersi. Sampel mengalami R5 hanya mengalami 1 transisi yaitu pada (c.745; **G>A**). Sampel mengalami R5 mengalami 2 transversasi yaitu pada (c.206,748; **C>A**), dan tidak dijumpai adanya insersi.. Hasil *alignment* dapat dilihat pada **Lampiran.5**

Sampel selanjutnya dianalisis dengan software MEGA X 10 untuk mengetahui homologi melalui *phylogenetic tree* antara sampel dan juga beberapa referensi 11 isolat *Escherichia coli* penghasil dengan ESBL pada data NCBI dengan

kode isolat (NG\_050238.1, MT387477.1, MT789719., MW183893.1, dan MW183897.1).

Kode NG\_050238.1 merupakan *Escherichia coli* S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206. Kode MT387477.1 merupakan *Escherichia coli* yang diisolasi dari ayam, anjing, babi di provinsi Gansu dan Qinghai. Kode MT789719.1 adalah *Escherichia coli* strain 270477-1 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-1 (blaTEM) gene yang diisolasi dari babi. Kode MW183893.1 dan MW183897.1 adalah *Escherichia coli* strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM) dari feses dan urin manusia. Hasil filogenetik gen TEM apabila dibandingkan diantara sampel dan juga *Escherichia coli* penghasil dengan ESBL pada NCBI dengan *Neighbor-Joining method* (Tamura *et al.*, 2011) dapat dilihat pada **Gambar 5.10**.



**Gambar 5.10.** *Phylogenetic Tree E. coli* Penyandi Gen TEM dari Sapi Bali dengan Berbagai Referensi di NCBI menggunakan *Neighbor-Joining method*.

**Keterangan:** TEM R1: Sampel 1R; TEM R2: Sampel 2R; TEM R5: Sampel 5R; (NG\_050238.1, MT387477.1, MG653169.1, MT789719.1, MW183893.1, dan MW183897.1): Referensi.

**Gambar 5.10** menunjukkan bahwa analisis filogenetik menggunakan *Neighbor-Joining method* untuk gen TEM *Escherichia coli* dari saluran reproduksi sapi Bali dengan kode (TEM\_R2, R5) terletak dalam kelompok tersendiri dengan bootstraps 56% yang berdekatan dengan R1 dengan bootstraps 45%.

Kode TEM\_R1 dan R2, dan R5 berkerabat dengan kode MG653169.1, MT789719.1 dan dengan nilai bootstraps 45%. Kekerbatan Kode TEM\_R1 dan R2, dan R5 dengan referensi yaitu kode NG\_050238.1 mempunyai nilai bootstraps 45%, dimana kode NG\_050238.1 terletak satu kelompok dengan kode MW183893.1, dan MW183897.1

Hasil penelitian yang menunjukkan bahwa *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* menyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaTEM pada kode sampel TEM\_R1 dan R2, dan R5 berkerabat *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaTEM dengan kode MT387477.1, MT789719.1, MW183893.1, dan MW183897.1 dan referensi NG\_050238.1 bootstraps 45%.

Kode MT387477.1 merupakan *Escherichia coli* yang diisolasi dari ayam, anjing, babi di provinsi Gansu dan Qinghai. Kode MG653169.1 adalah *Escherichia coli strain SRT41* ESBL yang diisolasi dari sungai Yamuna India.

Kode MW183893.1 dan MW183897.1 adalah *Escherichia coli strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM)* dari feses dan urin manusia.

Hasil data sekuensing yang telah ditata menggunakan *software bioedit* untuk gen CTX-M dari *Escherichia coli* penghasil ESBL pada masing-masing sampel adalah sebagai berikut:

```

.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
CTXM_R1  -CACGCGACC -ATCACGTCA CAGTATTCAT GGGAGCCACG ACCATTTTCG
CTXM_R2  CCACGCGACC CATCACGTCA CAGTATTCAT GGGAGCCACG ACCATTTTCG
CTXM_R5  -CACGCGACC -ATCACGTCA CAGTATTCAT GGGAGCCACG ACCATTTTCG

.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90          100
CTXM_R1  CCGACAAAAC CGACGGCATG GGAATCATCA ACCATGACCA GCGCGTCGTA
CTXM_R2  CCGACAAAAC CGACGGCATG GGAATCATCA ACCATGACCA GCGCGTCGTA
CTXM_R5  CCGACAAAAC CGACGGCATG GGAATCATCA ACCATGACCA GCGCGTCGTA

.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
CTXM_R1  TTTATCCGCC AGATCGCAA CGCCTTTCAG GTTAGCGATC ACACCATCCA
CTXM_R2  TTTATCCGCC AGATCGCAA CGCCTTTCAG GTTAGCGATC ACACCATCCA
CTXM_R5  TTTATCCGCC AGATCGCAA CGCCTTTCAG GTTAGCGATC ACACCATCCA

.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
CTXM_R1  TAGAGAACAC GCCATCAGTG GCGATCAGGA TATGACGAGC GCCCGCTTCA
CTXM_R2  TAGAGAACAC GCCATCAGTG GCGATCAGGA TATGACGAGC GCCCGCTTCA
CTXM_R5  TAGAGAACAC GCCATCAGTG GCGATCAGGA TATGACGAGC GCCCGCTTCA

.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
CTXM_R1  CGTGCTTCTT TCAGGCGAGC TTCCAGCTCC ACCATATCGT TGTGCGGTA
CTXM_R2  CGTGCTTCTT TCAGGCGAGC TTCCAGCTCG ACCATATCGT TGTGCGGTA
CTXM_R5  CGTGCTTCTT TCAGGCGAGC TTCCAGTTCC ACCATATCGT TGTGCGGTA

.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
CTXM_R1  ACGGAAACGT TTTGCTTTAC ACAGACGAAC GCCATCTATG ATAGAAGCGT
CTXM_R2  ACGGAAACGT TTTGCTTTAC ACAGACGAAC GCCATCAATG ATAGAAGCGT
CTXM_R5  ACGGAAACGT TTTGCTTTAC ACAGACGAAC GCCATCTATG ATAGAAGCGT

.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
CTXM_R1  GGCTCAAGG CAATACGA-- -----
CTXM_R2  GGCTCAAGG CAATACG--- -----
CTXM_R5  GGCTCAAGG CAATACGA-- -----

```

Hasil sekuensing disekuensing didapatkan 318 nukleotida dari gen CTX-M untuk sampel R1 dan R5, sedangkan untuk kode sampel R2 didapatkan 317 nukleotida. Hasil sekuensing gen penyandi CTX-M *Escherichia coli* kemudian disejajarkan (*alignment*) dengan referensi KX669628.1 untuk mengetahui adanya mutasi menggunakan software Mega X.



Hasil analisis pensejajaran gen CTX-M *Escherichia coli* asal sampel (sampel 1R, Sampel 2R dan sampel 5R) dengan referensi KX669628.1 menunjukkan terjadinya transisi, delesi, dan transversi.

Sampel R1 mengalami transisi sekitar 72 nukleotida yang contohnya dapat dilihat pada (c.311,317,329,330,332,404,410,471,489,498,510,512,535,576,526; A>G) dan (c.312,327,450,457,469,504,530,531,543,549,563,567,572,584,590; C>T). Sampel R1 mengalami transversi sekitar 80 nukleotida yang contohnya dapat dilihat pada (c.349,352,407,411,494,518,528,542,564,566,591; A>T) dan (c.307,351,389,415,443,445,488,524,527,532,560,586,587,610,612,614; G>T).

Sampel R2 mengalami transisi sekitar 75 nukleotida yang contohnya dapat dilihat pada (c.311, 317, 329, 330, 332, 404, 410, 471, 489, 498, 510, 512, 535, 576, 526; A>G) dan (c.306, 358, 361, 378, 384, 391, 401, 436-438, 459, 461, 468, 470, 478, 483, 534, 552, 559, 571, 573, 593, 595, 598, 600, 612, 613, 622,6 25; G>A). Sampel R2 mengalami transversi sekitar 79 nukleotida yang contohnya dapat dilihat pada (c.349, 352, 407, 411, 494, 518, 528, 542, 564, 566, 591; A>T) dan (c.297, 309, 338, 452, 472, 486, 496, 574, 579, 620, 624; T>A).

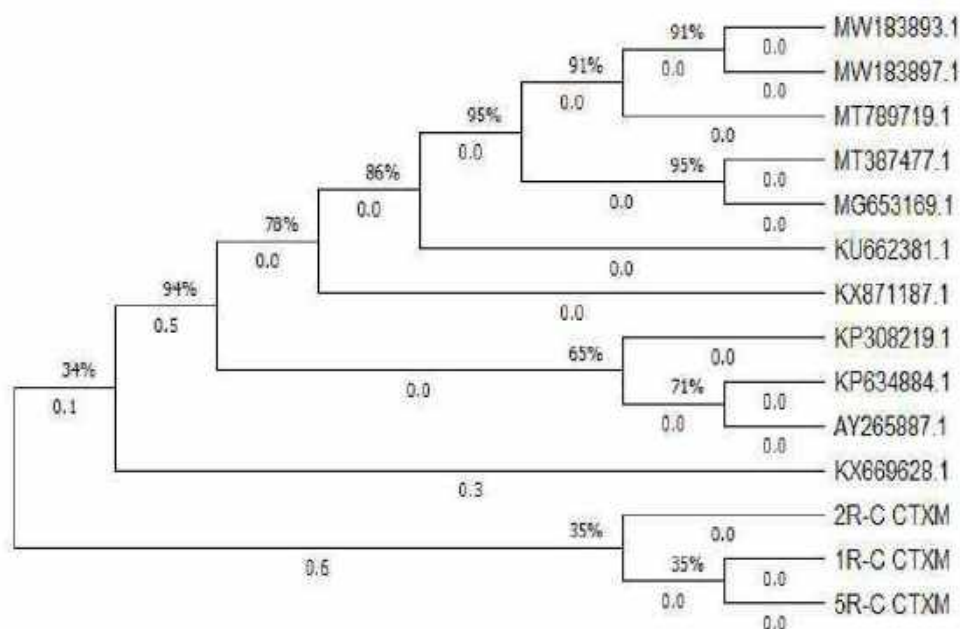
Sampel R5 mengalami transisi sekitar 72 nukleotida yang contohnya dapat dilihat pada (c.311,317,329,330,332,404,410,471,489,498,510,512,535,576,526; A>G) dan (c.306, 358, 361 ,378, 384, 391, 401, 436-438, 459, 461, 468, 470, 478, 483, 534, 552, 559, 573, 593, 595, 598, 600, 613, 622, 625; G>A). Sampel R5 mengalami transversi sekitar 80 nukleotida yang contohnya dapat dilihat pada (c.349, 352, 407, 411, 494, 518, 528, 542, 564, 566,591; A>T) dan (c.307, 351, 389, 415, 443, 445, 488, 524, 527, 532, 560, 586, 587, 610, 612, 614; G>T). Hasil lengkap dari *aligment* dapat dilihat pada **Lampiran. 6**.

Sampel selanjutnya dianalisis dengan software MEGA X 10 untuk mengetahui homologi melalui *phylogenetic tree* antara sampel dan juga beberapa referensi 11 isolat *Escherichia coli* penghasil dengan ESBL pada data NCBI dengan kode isolat isolat *Escherichia coli* penghasil dengan ESBL pada data NCBI dengan kode isolat (KX669628.1, KU662381.1, MT789719.1, AY265887.1, MT387477.1, MG653169.1, KX871187.1, KP634884.1, KP308219.1, MW183893.1 dan MW183897.1).

Kode KX669628.1 adalah *Escherichia coli* ini termasuk dalam GEN blaCTX-M-14. Kode KU662381.1 adalah *Escherichia coli strain* W21 TEM *beta-lactamase* (blaTEM) *gene, partial* asal isolat india. Kode MT789719.1 adalah *Escherichia coli strain* 270477-1 *class A broad-spectrum beta-lactamase*. Kode MT387477.1 adalah *Escherichia coli Drug Resistant* dan ESBL *Escherichia coli* dari ayam dan babi. Kode MG653169.1 adalah *Escherichia coli strain* SRT41 *Extended Spectrum Beta lactamase* yang diisolasi dari sungai Yamuna India.

Kode KX871187.1 adalah *Escherichia coli strain* 36-A *extended spectrum beta-lactamase* yang diisolasi dari manusia. Kode AY265887.1 adalah *Escherichia coli beta-lactamase* (blaTEM) *gene, blaTEM-116 allele* dari satwa liar. Kode KP634884.1 dan KP308219.1 adalah *Escherichia coli strain* RIGLD-1B12-F2 TEM-116 (*tem-116*) *gene* dari unggas. Kode MW183893.1 dan MW183897.1 adalah *Escherichia coli strain* U-10 TEM *family beta-lactamase* (blaTEM) dari feses dan urin manusia.

Hasil filogenetik gen CTX-M apabila dibandingkan diantara sampel dan juga *Escherichia coli* penghasil dengan ESBL pada NCBI dengan *Neighbor-Joining method* dapat dilihat pada **Gambar 5.11**.



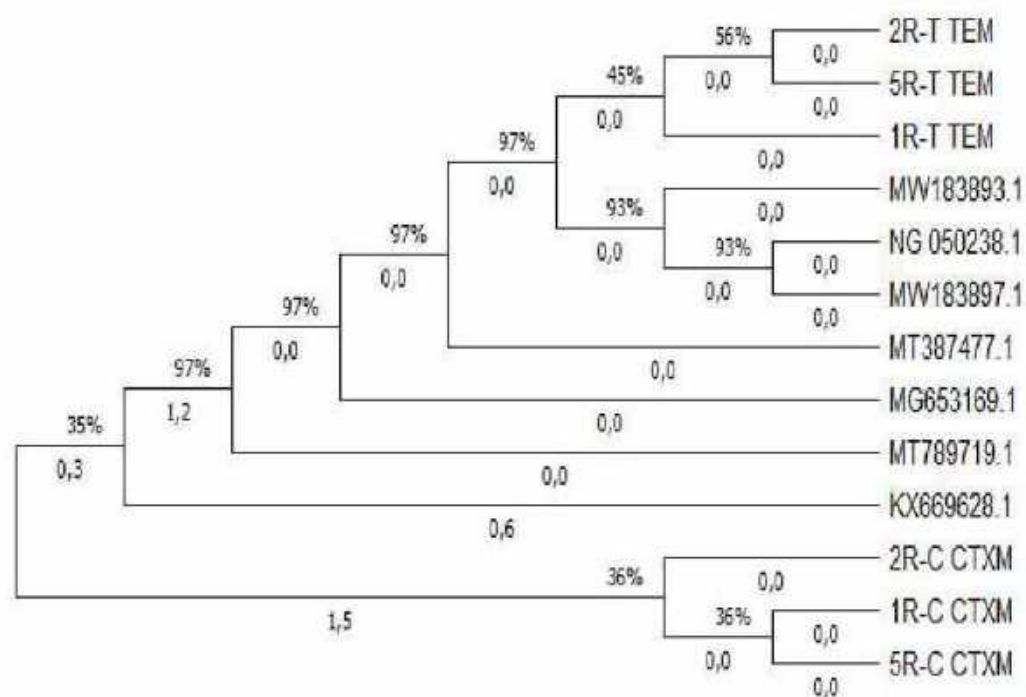
**Gambar 5.11.** *Phylogenetic Tree E. coli* Penyandi Gen CTX-M dari Sapi Bali dengan Berbagai referensi di NCBI menggunakan *Neighbor-Joining method* .

**Keterangan:** 1R-C-CTXM: Sampel R1; 2R-C-CTXM: Sampel R2, dan 5R-C-CTXM: Sampel R5; (KX669628.1, KU662381.1, MT789719.1, MT387477.1, MG653169.1, KX871187.1, AY265887.1, KP634884.1, KP308219.1, MW183893.1 dan MW183897.1): Referensi

**Gambar 5.11** menunjukkan bahwa gen CTX-M *Escherichia coli* dari saluran reproduksi sapi Bali (CTX-M\_R1, R2, dan R5) tertletak dalam satu dengan *bootstrap* 35% dengan jarak 0,0. Kelompok sampel mempunyai posisi kelompok yang berbeda dengan *Escherichia coli* penghasil ESBL gen blaCTX-M referensi KX669628.1 yang merupakan kode KX669628.1 adalah *Escherichia coli* ini termasuk dalam gen blaCTX-M-14. *Escherichia coli* penghasil ESBL gen blaCTX-M mempunyai *bootstrap* 34% dengan kelompok lain yang berikan *Escherichia coli* penghasil ESBL data data *GenBank*.

Seluruh sampel *Escherichia coli* yang positif menyandi gen *Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) baik gen bla TEM dan bla CTX-M dari cairan

saluran reproduksi sapi Bali, selanjutnya dianalisis dalam filogenetik secara bersamaan dengan referensi yang telah digunakan untuk mengetahui kekerabatan dan asal *Escherichia coli* yang positif menyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL). Hasil filogenetik dapat dilihat pada **Gambar 5.12**



**Gambar 5.12.** *Phylogenetic Tree E. coli* Penyandi Gen TEM dan CTX-M dari Sapi Bali dengan Berbagai Referensi di NCBI menggunakan *Neighbor-Joining method*.

**Keterangan:** TEM R1: Sampel 1R; TEM R2: Sampel 2R; TEM R5: Sampel 5R; 1R-C-CTXM: Sampel R1; 2R-C-CTXM: Sampel R2, dan 5R-C-CTXM; Sampel R5; (KX669628.1, MT789719.1, MT387477.1, MG653169.1, MW183893.1 dan MW183897.1): Referensi

**Gambar 5.12** Menunjukkan bahwa analisis filogenetik menggunakan *Neighbor-Joining method* untuk gen TEM *Escherichia coli* dari saluran reproduksi sapi Bali (TEM\_R1, R2 dan R5) terletak dalam kelompok tersendiri yang berkerabat dengan referensi NG\_050238.1 dan berdekatan MT387477.1, MT789719.1, MW183893.1 dan MW183897.1 dengan bootstraps 97% dengan jarak 0,0.

Hasil analisis filogenetik secara keseluruhan menunjukkan bahwa gen TEM *Escherichia coli* dari saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* (TEM\_R5, R1, R2) pada penelitian cenderung berkerabat dengan gen bla TEM dengan kode referensi (MW183897.1, MW183893.1) dan (MT387477.1, MT789719.1) dengan bootstraps 97 %. Kode MW merupakan isolat *Escherichia coli* strain U-10. Kode MT merupakan *E coli* isolat CD8 dan *E coli strain 270477-1 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-1 (blaTEM) gene*. Kode MW berasal dari feses dan urin manusia sedangkan untuk kode MT merupakan isolat *Escherichia coli* yang berasal dari hewan ternak ayam dan babi.

Analisis filogenetik gen CTX-M *Escherichia coli* dari saluran reproduksi sapi Bali (CTX-M\_R1, R2, dan R5) terletak dalam satu kelompok dengan *bootstrap* 36% dengan jarak 0,0. CTX-M *Escherichia coli* (R1, R2, R3) asal sampel berkerabat dengan *Escherichia coli* penghasil ESBL gen blaCTX-M referensi KX669628.1 (blaCTX-M-14), KP308219.1 (*Escherichia coli strain RIGLD-1B9-F1 beta-lactamase TEM-1 gene partial*) dan KX871187.1 (*Escherichia coli strain 36-A extended spectrum beta-lactamase (blaTEM) gene*, dengan *bootstrap* 35%. Kode KX merupakan isolat asal manusia.

Berdasarkan penelitian mulai identifikasi *Escherichia coli* secara morfologi, uji biokimia dan uji resistensi terhadap antibiotik sampai analisis karakter *Escherichia coli* dengan PCR dan sekuensi mengenai Gen penyandi *Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* di Pulau Lombok didapatkan 3 sampel yang mengandung *Escherichia coli* penyandi gen bla TEM dan CTX-M. Tabulasi

berdasarkan letak asal *Escherichia coli* ari cairan reproduksi yang positif ditemukan gen penyandi ESBL yang dapat dilihat pada **Tabel 5.6**.

**Tabel 5.6.** Gen ESBL *Escherichia coli* Berdasar Letak Pengambilan Sampel

Lokasi	Jumlah sampel	Positif Kultur <i>E. coli</i>	Kode Sampel Positif PCR	Gen ESBL (Referensi)
<b>1. Desa Kopang Kabupaten Lombok Tengah</b>	8	3 (1R, 2R, 3R)	(1R, 2R)	- MT387477.1 <i>Escherichia coli</i> isolate GD8 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116 (blaTEM) gene Asal hewan ternak - MW183897.1 <i>Escherichia coli</i> strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM) dari feses dan urin manusia. - NG_050238.1 <i>Escherichia coli</i> S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206 - KX669628.1 <i>Escherichia coli</i> strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-14 allele, partial cds.
<b>3. Desa Lando Kabupaten Lombok Timur</b>	8	2 (5R, 6R)	5R	- NG_050238.1 <i>Escherichia coli</i> S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206 - MT387477.1 <i>Escherichia coli</i> isolate GD8 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116 (blaTEM) gene Asal hewan ternak - MW183897.1 <i>Escherichia coli</i> strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM) dari feses dan urin manusia. - KX669628.1 <i>Escherichia coli</i> strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-14 allele, partial cds.
<b>4. Desa Pringga Jurang Kabupaten Lombok Timur</b>	6	0	0	-
Total	22	5 (22,7%)	3 (1R, 2R) dan 5R (13,6%)	<i>E. coli</i> blaTEM-116, <i>E. coli</i> strain U-10 TEM, <i>E. coli</i> blaTEM-206 kombinasi blaCTX-M-14

**Tabel 5.6** mendeskripsikan bahwa 5 sampel (22,7%) dari 22 sampel cairan reproduksi pada sapi Bali yang mengalami repeat breeder yang dikonfirmasi dengan

ditemukannya *Escherichia coli*, sebanyak 3 sampel dari Desa Kopang, dan sebanyak 2 sampel dari Desa Lando, sedangkan di Desa Pringga Jurang tidak dijumpai ditemukannya *Escherichia coli*.

Lima sampel tersebut digunakan untuk mengkarakter Gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi Sapi Bal. Hasil menunjukkan bahwa 3 (13,6%) sampel dari 5 sampel menyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL). Sampel *Escherichia coli* dengan kode R1, R2 dan R5 berdasarkan kekerabatan filogenetik dengan referensi menyandi *Escherichia coli* class A *broad-spectrum beta-lactamase* TEM-116 (blaTEM) asal feses hewan ternak dan *Escherichia coli* strain 270477-1 class A *broad-spectrum beta-lactamase* asal feses atau urin manusia serta *Escherichia coli* TEM-206 *lactamase* asal hewan yang berkombinasi dengan gen penyandi blaCTX-M-14 asal manusia yang berkombinasi dengan gen penyandi blaCTX-M-14 asal manusia. Kedua gen tersebut termasuk kelas A dalam kalsifikasi secara molekuler menurut *Ambler's molecular class* (Ambler, 1980)

## **BAB VI**

### **PEMBAHASAN**

#### **6.1 Analisis Kultur *Escherichia coli***

Hasil kultur pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) didapatkan hanya 5 isolat bakteri yang menunjukkan ciri-ciri *Escherichia coli* dari 22 sampel cairan reproduksi sapi Bali betina yang mengalami kawin berulang (*repeat breeder*). Hal ini disebabkan kemungkinan kecil saluran reproduksi terkontaminasi oleh *Escherichia coli* karena *Escherichia coli* merupakan flora normal pada usus sapi. Kontaminasi saluran reproduksi oleh *Escherichia coli* dapat disebabkan oleh penanganan *post partus* pada sapi yang kurang baik atau adanya penanganan kasus seperti distokia, retensio plasenta dan pelaksanaan Inseminasi Buatan (IB) yang kurang aseptis serta sanitasi yang kurang baik. Arthur *et al.* (2001) menyatakan bahwa lingkungan yang buruk terutama pada pascapartus akan memudahkan masuknya mikroba ke dalam lumen uterus, mencemari lingkungan lumen uterus, mengganggu kehidupan embrio yang dapat menyebabkan kematian embrio dini.

Hasil pengamatan koloni *Escherichia coli* dalam media EMBA pada menunjukkan bahwa *Escherichia coli* yang tumbuh berwarna hijau metalik, berkilau dengan pusat warna gelap. Warna hijau metalik terjadi adanya reaksi antara bakteri dengan *Methylene blue*. Cornelissen *et al.* (2013) mendokumentasikan bahwa *Escherichia coli* pada medium *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) berwarna hijau metalik berkilau seperti logam.

Hasil pengamatan morfologi *Escherichia coli* secara mikroskopis dengan perbesaran 1000x menunjukkan bahwa *Escherichia coli* berwarna merah muda dan berbentuk batang pendek disebabkan *Escherichia coli* adalah bakteri merupakan



gram negatif yang mempunyai dinding yang lebih tipis, bakteri tersebut tidak mampu mengikat warna kristal violet dan hanya terwarnai oleh safranin karena asam-asam ribonukleat pada sitoplasma sel-sel *gram negative* tidak membentuk ikatan yang lebih kuat dengan kompleks ungu kristal violet sehingga hanya terwarnai oleh safranin. Bakteri gram negatif ditandai dengan warna merah muda yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak mampu mengikat warna kristal violet dan hanya terwarnai oleh safranin.

Hasil uji biokimia dari *Escherichia coli* yang berhasil diisolasi pada penelitian ini menghasilkan tes *indole* positif dan tidak motil pada media *Sulfide Indole Motility* (SIM), serta memfermentasi gula (Maltosa, Glukosa, laktosa dan Manitol). Uji katalase menunjukkan positif, sedangkan untuk uji oksidase negatif. Hasil uji biokimia ini sesuai dengan Cornelissen *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa *Escherichia coli* pada uji *indole* menunjukkan hasil positif dan reaksi negatif untuk uji sitrat. Hasil uji Indol dan katalase negatif pada *Escherichia coli* dapat dijadikan dasar dalam membedakan *Escherichia coli* dengan bakteri saluran pencernaan lain.

## **6.2 Analisis Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik**

Hasil penelitian tentang uji kepekaan terhadap antibiotik sebagai dasar untuk mengisolasi bakteri *Escherichia coli* penghasil *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases* (ESBL) didapatkan bahwa 5 (100%) *Escherichia coli* yang berhasil resisten terhadap *Penicillin G*, 4 (80%) *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Oxytetracycline*, 4 (80%) *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Gentamicin*, dan hanya satu (20%) *Escherichia coli* yang resisten terhadap *Tetracycline*, sedangkankan untuk *Cefotaxime* (CTX) terdapat 3 (60%) *Escherichia coli* dari 5 *Escherichia coli* yang berhasil diisolasi.

Fakta ini menunjukkan bahwa resistensi *Escherichia coli* sudah terjadi pada berbagai antibiotik yang telah digunakan dipeternakan sapi Bali termasuk yang mengalami *repeat breeder*. Pemberian antibiotik yang kurang terkontrol akan menyebabkan bakteri *Escherichia coli* beradaptasi dan bermutasi termasuk gen penyandi *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases* (ESBL) yang terdapat pada kromosom dan plasmid. Hasil ini selaras dengan pernyataan tentang profil AMR dari *Escherichia coli* hampir mencerminkan penggunaan antimikroba pada hewan untuk produksi makanan (EFSA, 2011). *Escherichia coli* juga telah diisolasi sapi Bali telah resisten terhadap *Erythromycin*, *Tetracycline*, dan *Ciprofloxacin* (Gunawan dkk., 2018).

Hasil tentang *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik yang non betalaktam seperti golongan *Tetracycline* dan *Gentamicin* dikarenakan antibiotik golongan ini merupakan antibiotik yang sering digunakan untuk terapi gangguan reproduksi atau bisa terjadinya transfer gen resistensi. Salah satu mekanisme terjadinya resistensi terjadi adanya perubahan produksi enzimatis akibat mutasi gen penyandi pada *Escherichia coli*, sedangkan gen tersebut bisa ditransfer dilingkungan mikro bakteri. ESBL yang paling umum dternak seperti TEM dan CTX-M telah ditemukan di ternak dan manusia. Data penelitian menunjukkan bahwa gen CTX-M-1 dan CTX-M-9 *Escherichia coli* dapat menyebabkan *multidrug resistance* (Sudarwanto *et al.*, 2016). *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL tipe TEM dan CTX-M gene juga telah ditemukan pada feses sapi dan lingkungan di Peninsular Malaysia (Kamaruzzaman *et al.*, 2020).

Hasil uji adanya ESBL *Escherichia coli* pada penelitian ini untuk uji fenotipik dengsn *Double-disk diffusion* menunjukkan bahwa *Clavulanate* dalam cakram AMC

berdifusi pada agar dan menghambat  $\beta$ -laktamase di sekitar cakram *Cefotaxime* (CTX). Igwe *et al.* (2014) menyatakan bahwa perluasan zona cakram *ceftazidime* di sekitar (*side facing*) cakram AMC diinterpretasikan sebagai hasil positif. Hasil pengujian *Double-disk diffusion* dengan kenaikan 5 mm dalam diameter zona untuk agen antimikroba yang diuji dengan asam klavulanat versus zonanya saat diuji sendiri dapat diduga bahwa mikroorganisme tersebut menghasilkan *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases* (ESBL).

### 6.3 Analisis PCR gen TEM, CTX-M dan VEB *Escherichia coli*

Hasil analisis kemurnian ekstraksi DNA *Escherichia coli* dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer berdasarkan rasio absorbansi  $\lambda=260$  nm terhadap nilai absorbansi  $\lambda=280$  nm berada diantara 1,60-2,4, sedangkan berdasarkan rasio absorbansi  $\lambda=230$  nm terhadap nilai absorbansi  $\lambda=260$  berada diantara 0,83-1,88. Sambrook *et al.* (1989) menyatakan bahwa sampel DNA dikatakan murni jika nilai absorbansi 260 terhadap nilai absorbansi 280 berada diantara 1,75-2,0. Jika rasio tersebut 2,0 maka DNA masih mengandung RNA. Sampel hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* menunjukkan DNA murni tanpa kontaminasi protein atau RNA.

Hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* secara kualitatif dengan elektroforesis agarosa 1% (b/v) menunjukkan bahwa DNA *Escherichia coli* pada penelitian ini berada pada 9 kilobase pair (kb) atau 9000 pasang basa. Hasil DNA *Escherichia coli* dari hasil ekstraksi diamplifikasi dengan primer gen blaTEM 581 bp, blaCTX-M 579 bp, dan blaVEB 568 bp dengan teknik PCR untuk mengkarakterisasi gen penyandi ESBL, Hasil PCR menunjukkan bahwa dengan menggunakan primer blaTEM (*Temoneira*), blaCTX-M diperoleh hasil 3 sampel yang positif dari 5 sampel hasil ekstraksi DNA *Escherichia coli* yaitu sampel dengan kode 1R, 2R, dan

5R. Hasil Amplifikasi menggunakan primer blaCTX-M (*Cefotaxime-Munich*) diperoleh hasil 3 sampel positif mengandung gen CTX-M yaitu sampel dengan kode 1R, 2R, dan 5R. Sampel positif *Escherichia coli* yang positif blaTEM dan blaCTX-M adalah sampel yang sama yaitu sampel dengan kode 1R, 2R dan 5R, sementara dengan menggunakan primer blaVEB tidak ada sampel yang positif.

Hasil PCR gen blaTEM sampel dengan kode 1R pada band agarose elektroforesis berada pada posisi 1100 bp (*base pair*), sampel kode 2R dan sampel kode R5 berada pada posisi 560 bp selaras dengan beberapa penelitian yang mendokumentasikan posisi gen TEM pada band agarose. Agrawa *et al.* (2021) menyatakan bahwa blaTEM yang diisolasi *Escherichia coli* dari urin sapi perah yang mengalami infeksi uterus di India berada pada 800 bp. Kamaruzzaman *et al.* (2020) juga menemukan gen blaTEM *Escherichia coli* pada sapi perah berada pada sekitar 500 bp.

Hasil PCR gen CTX-M sampel dengan kode 1R, 2R dan 5R pada *band agarose* elektroforesis berada pada posisi 370 bp pada band agarose yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan beberapa penelitian. Agrawa *et al.* (2021) menyatakan bahwa blaCTX-M pada *Escherichia coli* dari urin sapi perah yang mengalami infeksi uterus di India berada pada 580 bp. Hasil tersebut menunjukkan ukuran molekul gen *bla* CTX-M pada sampel *Escherichia coli* lebih rendah kerana terdapat variasi tentang posisi gen *bla* CTX-M *Escherichia coli* pada gel agarose elektroforesis dalam beberapa hasil penelitian. Kamaruzzaman *et al.* (2020) juga menemukan gen *bla* CTX-M *Escherichia coli* pada sapi perah berada pada sekitar 400 bp. Faktor-faktor tersebut antara lain adalah ukuran molekul DNA, konsentrasi gel agarosa, konformasi DNA, voltase, keberadaan pewarna DNA, komposisi buffer elektroforesis. Hasil PCR dari gen VEB tidak ditemukan pada sampel

*Escherichia coli* pada penelitian ini. Hal ini disebabkan *Escherichia coli* asal sampel tidak menyandi gen VEB.

Hasil *alignment* dengan gen referensi untuk analisis mutasi menggunakan baik pada gen TEM dan CTX-M *Escherichia coli* penghasil ESBL dari sampel cairan reproduksi sapi Bali. Hasil *alignment* *Escherichia coli* penyandi gen TEM apabila dibandingkan referensi dengan kode NG\_050238.1 di NCBI menunjukkan bahwa sampel mengalami R1 mengalami transisi sekitar 19 nukleotida, transversi sekitar 29 nukleotida, dan insersi 3 nukleotida. Sampel R2 mengalami transisi sekitar 2 nukleotida, transversi sekitar 3 nukleotida dan tidak dijumpai. Sampel R5 mengalami transisi sekitar 1 nukleotida, dan transverai sekitar 2 nukleotida dan tidak dijumpai delesi.

Hasil *alignment* pada gen CTX-M *Escherichia coli* dengan referensi Kode KX699628.1 menunjukkan sampel R1 mengalami transisi sekitar 72 nukleotida, dan transversi sekitar 80 nukleotida. Sampel R2 mengalami transisi sekitar 75 dan transversi sekitar 79 nukleotida. Sampel R5 mengalami transisi sekitar 72 nukleotida dan transversi sekitar 80 nukleotida.

Mutasi basa yang terjadi pada penelitian ini adalah bersifat transisi, trvasversi dan delesi yang merupakan mutase titik. Mutasi gen adalah perubahan urutan-urutan DNA atau lebih tepatnya mutasi titik merupakan perubahan pada basa N dari DNA atau RNA. Mutasi yang terjadi pada urutan nukleotida penyandi gen TEM tersebut mengakibatkan peningkatan aktifitas enzim betalaktamase sehingga *Escherichia coli* penghasil ESBL pada penelitian ini resisten terhadap antibiotik golongan Pinisilin. Hasil sekuen ini sinkron dengan hasil uji kepekaan terhadap antibiotik dimana sampel dengan kode R1, R2, dan R5 resisten terhadap Pinisilin

bahkan untuk sampel R1 dan R5 resisten terhadap sefotaksim yang merupakan golongan *cephalosporin*.

Mutasi Gen penyandi tersebut dapat terjadi akibat ditransfers secara vertikal maupun horizontal. Transfer secara vertikal dapat terjadi pada keterunan bakteri saat berpropagasi, sedang secara horinsontal dapat terjadi pertukaran plasmid pembawa gen tersebut pada komunitas bakteri baik pada saluran reproduksi ataupun lingkungan. Mutasi Gen penyandi tersebut dapat terjadi pula akibat penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol. Antibiotik golongan  $\beta$ -lactam merupakan salah satu antibiotik yang paling sering digunakan pada peternakan dan telah menimbulkan gen resistensi (Huang *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2018).

Hasil ini megindikasikan bahwa adanya mutasi titik dapat mempengaruhi fenotip yang ditandai peningkatan aktifitas enzim betalaktamase. Yuwono (2011) menyatakan bahwa kemampuan bakteri penghasil ESBL menghidrolisis antibiotik  $\beta$ -laktam secara luas disebabkan oleh sejumlah mutasi pada beberapa gen seperti SHV, TEM, OXA dan sebagainya (Yuwono, 2011).

#### **6.4 Analisis *Phylogenic tree* Gen TEM dan CTX-M *Escherichia coli***

Hasil analisis *Phylogenic tree* (pohon filogenetik) untuk seluruh sampel dengan berbagai referensi gen di NCBI yang menunjukkan bahwa *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* menyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaTEM pada kode sampel R1 dan R2, dan R5 terdapat pada satu kelompok dengan mempunyai bootstraps 45%. Pada analisis filogenetik kode sampel R1 dan R2, dan R5 menunjukkan kekerabatan *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaTEM dan referensi

MT387477.1, MT789719.1, MW183893.1 dan MW183897.1 dengan *bootstraps* 97% dengan dengan jarak 0,0.

Hal tersebut terjadi karena minimnya mutasi pada gel blaTEM dari sampel *Escherichia coli*. Pada pohon filogenetik juga menunjukkan bahwa kode NG\_050238.1 sebagai referensi primer terletak satu kelompok dengan kode MW183893.1, dan MW183897.1 dan mempunyai kekerabatan dengan MT387477.1 dan MT789719.1 dengan *bootstraps* 97%.

Pada analisis filogenetik menunjukkan bahwa *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* menyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaCTX-M pada kode sampel R1, R2, dan R5 mempunyai nilai *bootstraps* 36%. Pada analisis filogenetik sampel dengan kode CTX-M R1, R2, dan R5 mempunyai kekerabatan dengan kode KX699628.1 merupakan *Escherichia coli strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14* dengan nilai *bootstraps* 36%.

Evaluasi nilai bootstrap dari gen TEM yang disandi *Escherichia coli* pada sampel R1 dan R2 dan R5 yang mempunyai nilai 45%. Hal yang sama ditunjukkan gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaCTX pada kode sampel R1, R2, dan R5 mempunyai nilai *bootstraps* 36% dengan kekerabatan *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) CTX-M R1, R2, dan R5 dengan kode KX699628.1 dengan nilai *bootstraps* 35%.

Hasil tersebut menunjukkan kisaran nilai *bootstraps* yang lemah kerana kategori nilai *bootstrap* meliputi tinggi (>85%), moderat (70–85 %), lemah (50–69 %), atau sangat lemah (<50 %) (Kress *et al.*, 2002). Nilai *bootstraps* yang lemah masih lebih bagus daripada topologi berdasarkan morfologi. Chatrou *et al.* (2012)

menyatakan topologi dari pohon filogenetik memberikan klarifikasi yang lebih besar dibandingkan pengelompokan dengan karakter morfologi meskipun memiliki nilai *bootstrap* yang rendah.

Pada analisis filogenetik R1, R2 dan R5 menunjukkan kekerabatan dengan *Escherichia coli* penyandi *Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaTEM dan referensi MT387477.1, MT789719.1, MW183893.1 dan MW183897.1 dengan *bootstraps* 97%.

Hasil evaluasi nilai *bootstraps* pada kekerabatan *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) blaTEM *Escherichia coli* R1, R2 dan R5 menunjukkan kekerabatan dengan referensi MT387477.1, MT789719.1, MW183893.1 dan MW183897.1 dengan *bootstraps* 97% bisa dinyatakan valid. Nilai *bootstrap* pada cabang pohon diyakini valid adalah 70% atau lebih untuk analisis NJ, UPGMA dan ML (Huelsenbeck & Hillis, 1993).

Hasil analisis filogenetik tersebut agar lebih meyakinkan, maka dikonfirmasi dengan data *GenBank* melalui *Blasting* di *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) untuk memperkuat hasil temuan pada penelitian ini. Hasil analisis *Blasting* Pada NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk ESBL *Escherichia coli* gen TEM untuk kode sampel R1, R2, dan R5 dapat dilihat pada Tabel **6.1**.



**Tabel 6.1.** Analisis *Blasting* gen TEM Sampel ESBL *E. coli* pada NCBI

Kode sampel	Kode akses referensi	Deskripsi	Kesamaan
R1 lcl Query_37471	<a href="#">MT387477.1</a>	<i>Escherichia coli</i> isolate GD8 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116 ( <i>bla</i> TEM) gene, <i>bla</i> TEM-116 allele, complete cds.  <i>Drug Resistant and ESBL types of Escherichia coli</i> isolates from Chicken, dogs, swine and Yaks in Gansu and Qinghai provinces	98%
R2 lcl Query_519889	<a href="#">MW183893.1</a>	<i>Escherichia coli</i> strain U-10 TEM family beta-lactamase ( <i>bla</i> TEM) gene, partial cds.  <i>MDR Escherichia coli</i> strains producing TEM in Urine and Stool isolates from Delhi	98%
R5	NG_050238.1	<i>Escherichia coli</i> S2.2-EK pEC-S2.2 <i>bla</i> TEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206, complete CDS	97 % (berdasarkan pohon filogenetik dengan Mega X10))

Berdasarkan **Tabel 6.1** menunjukkan bahwa *bla*TEM *Escherichia coli* dengan kode R1 memiliki kekerabatan dengan kode MT387477.1 pada data di *GenBank* dengan kesamaan 98%. Sampel dengan kode R2 memiliki kekerabatan dengan MW183893.1 pada data di *GenBank* dengan kesamaan 98%, sampel R5 memiliki kekerabatan dengan kode NG\_050238.1 pada data di *GenBank* dengan kesamaan 97% berdasarkan analisis filogenetik dengan *software* Mega X10.

Kode MT387477.1 merupakan *Escherichia coli* isolat GD8 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116 (*bla*TEM) yang diisolasi dari hewan seperti ayam, anjing, dan babi. Hal tersebut diyakini bahwa *Escherichia coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* menyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) *bla*TEM-116 yang terkontaminasi dari kotoran

hewan pada sampel dengan kode R1 yang terlatak di Kopang Kabupaten Lombok tengah.

Kode MW183893.1 merupakan *Escherichia coli strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM) gene, partial cds* dari feses dan urin dari manusia. Hal tersebut diyakini bahwa *Escherichia coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* menyandi adalah *Escherichia coli strain U-10* yang menyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) blaTEM* yang terkontaminasi dari feses atau urin manusia pada sampel dengan kode R2 yang terlatak di Kopang Kabupaten Lombok tengah.

Kode NG\_050238.1 merupakan *Escherichia coli S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206, complete CDS*. Hal tersebut diyakini bahwa *Escherichia coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* adalah *Escherichia coli S2.2-EK* yang menyandi gen *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) blaTEM* yang terkontaminasi dari feses atau urin manusia pada sampel dengan kode R2 yang terlatak di Kopang Kabupaten Lombok tengah.

Hasil analisis Blasting Pada NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk ESBL *E. coli* gen CTX-M untuk kode sampel R1, R2, dan R5 dapat dilihat pada Tabel **6.2**.

**Tabel 6.2.** Analisis *Blasting* Gen CTX-M Sampel *Escherichia coli* pada NCBI

Kode sampel	Kode akses referensi	Deskripsi	Kesamaan
R1, R2, R5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX669628.1/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX669628.1/</a>	<i>Escherichia coli</i> strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14 ( <i>bla</i> CTX-M) gene, <i>bla</i> CTX-M-14 allele, partial <i>cds</i> .  <i>Identification of allelic variants of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in Chile</i>	35%  (berdasarkan pohon filogenetik dengan Mega X10)

Berdasarkan **Tabel 6.2** menunjukkan bahwa gen *bla* CTX-M Sampel *Escherichia coli* berkerabat dengan kode KX699628.1 merupakan *Escherichia coli* strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14 (*bla*CTX-M) gene, *bla*CTX-M-14 allele, partial *cds* yang diisolasi dari manusia. Hal tersebut bisa dikatakan bahwa *Escherichia coli* dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* pada semua sampel kode (R1, R2, dan R5) yang terlatak di Lando menyandi gen *beta-lactamase* CTX-M-14 yang terkontaminasi dari manusia.

Hasil tersebut selaras dengan penelitian yang menyatakan bahwa *Escherichia coli* penghasil ESBL tipe TEM dan CTX-M gene juga telah ditemukan pada feses sapi dan lingkungan di Peninsular Malaysia (Kamaruzzaman *et al.*, 2020). Hal ini diperkuat dengan ditemukannya gen CTX-M-1 dan CTX-M-9 penyebab *multidrug resistance* telah terdeteksi sebesar 8.6% dari 220 sampel feses sapi pada rumah potong hewan di Bogor (Sudarwanto *et al.*, 2016).

Hasil penelitian menunjukkan kombinasi gen gen *bla*TEM dan *bla*CTX-M pada sampel *Escherichia coli* dari cairan reproduksi yang terkontaminasi dari ternak dan manusia.

Kontaminasi saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* oleh *Escherichia coli* dari feses maupun kotoran dan urin ternak dan manusia berdasarkan referensi di *GenBank* NCBI pada **Tabel 6.1** dan **Tabel 6.2** dapat melalui pemelihara ternak atau petugas yang kurang memperhatikan higienis dalam menangani sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* yang berkaitan dengan gangguan saluran reproduksi seperti penenganan *post partus*, Inseminasi Buatan dan kasus gangguan reproduksi yang lain.

Rafika dkk. (2020) menyatakan bahwa faktor predisposisi penyebab *repeat breeder* adalah akibat infeksi bakteri saat penanganan kasus distokia, retensi plasenta, prolapsus uterus, dan gangguan ovarium. Infeksi pada uterus bisa disebabkan oleh keadaan lingkungan saat melahirkan, namun retensi plasenta yang merupakan predisposisi paling penting (Sheldon *et al.*, 2008).

Kontaminasi *Escherichia coli* juga bisa akibat lingkungan yang kurang baik terutama post partus. Lingkungan yang kurang baik pascapartus akan memudahkan masuknya mikroba ke dalam lumen uterus, mencemari lingkungan lumen uterus, mengganggu kehidupan embrio yang dapat menyebabkan kematian embrio dini (Arthur *et al.*, 2001). Pemberian antibiotik yang kurang terkontrol saat penanganan kasus distokia, retensi plasenta, prolapsus uterus, dan gangguan ovarium akan jua menyebabkan bakteri akan memproduksi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).

*Escherichia coli* yang menyandi gen ESBL TEM dan CTX-M yang terdapat pada saluran reproduksi sapi Bali yang digunakan untuk sapi potong, selain berpengaruh terhadap reproduksi sapi akan berakibat fatal dalam rantai makanan dari peternakan sampei ke piring atau konsumen (*from farm to plate*). Founou *et al.* (2020) menyatakan bahwa Munculnya AMR dalam sebelum dan sesudah panen

dalam peternakan menimbulkan risiko serius dalam kontaminasi langsung oleh bakteri resisten antibiotik dan gen resistensi kepada petani, praktisi pertanian, pekerja rumah potong hewan, pekerja penanganan makanan yang berhubungan dengan konsumen pada rantai makanan dari peternakan ke konsumen.

Hasil tentang distribusi keberadaan gen kombinasi TEM dan CTX-M ESBL pada *Escherichia coli* didapatkan di Desa Kopang Kabupaten Lombok Tengah dan di Desa Lando Kabupaten Lombok Timur dikarenakan kedua kabupaten tersebut merupakan kabupaten yang kaya akan kelompok ternak yang masih tradisional, sehingga memungkinkan terjadinya penggunaan antibiotik yang kurang terkontrol, penanganan pakan yang minim dengan manajemen sanitasi yang kurang baik.

Kabupaten Lombok Tengah merupakan salah satu sentra pengembangan ternak potong di Provinsi Nusa Tenggara Barat dengan berbagai program untuk meningkatkan pengembangan sapi. Program yang telah dilaksanakan di wilayah kecamatan tersebut diantaranya adalah program P2RT, program PPA, program PASP, program Penggemukan dan program PAP. Program-program tersebut mendapat pendanaan yang bersumber dari APBN maupun dari dana alokasi umum (DAU) yang melibatkan 13 Kelompok Ternak (Winarso, 2009). Pada tahun 2013 di Kabupaten Lombok Timur terdapat sekitar 504 kelompok tani ternak yang terdiri dari kelas pemula berjumlah 238 kelompok, kelas lanjut berjumlah 236 kelompok, dan kelas madya berjumlah 30 (Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi NTB, 2015).

## 6.5 Temuan Baru

Hasil penelitian menunjukkan kebaruan dengan ditemukannya kombinasi gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) pada *Escherichia coli* yang berhasil dikarakter dari cairan reproduksi sapi Bali betina yang mengalami *repeat breeder* di Pulau Lombok, yaitu kombinasi antar gen  *$\beta$ -lactamase Temoneira* (blaTEM) dan  *$\beta$ -lactamase Cefotaxime-Munich* (blaCTX-M). Kombinasi gen penyandi ESBL tersebut antara lain adalah: *Escherichia coli* penyandi gen blaTEM-116 dan blaCTX-M-14, *Escherichia coli* U-TEM 10 dan blaCTX-M-14 serta *Escherichia coli* yang menyandi gen blaTEM-206 dan blaCTX-M-14.

Kombinasi gen  *$\beta$ -lactamase Temoneira* (blaTEM) dan  *$\beta$ -lactamase Cefotaxime-Munich* (blaCTX-M) yang disandi oleh sampel *Escherichia coli* membuktikan adanya interkoneksi antara kesehatan manusia, kesehatan hewan dan kesehatan lingkungan dalam tiga domain *One Health* dalam kejadian *antimicrobial resistance* (AMR). Gen  *$\beta$ -lactamase Temoneira* (blaTEM) pada sampel bisa berasal dari kotoran ternak dan juga manusia, sedangkan gen  *$\beta$ -lactamase Cefotaxime-Munich* (blaCTX-M) berasal dari manusia. Hal ini terjadi karena pada peternakan rakyat yang memelihara sapi Bali di Pulau Lombok tidak memelihara hanya memelihara sapi Bali saja namun memelihara unggas dalam satu lingkungan dengan sanitasi yang minim. Keadaan tersebut akan memicu tersebarnya *Escherichia coli* penyandi gen ESBL pada hewan, manusia dan lingkungan

Hasil ini menyatakan bahwa sanitasi dan biosekuriti dalam pemeliharaan hewan, khususnya sapi Bali dan tindakan yang legartis dalam penanganan kasus gangguan kasus reproduksi termasuk kasus *repeat breeder*. Kontrol terhadap

pemberian antibiotik dalam penanganan kasus reproduksi juga menjadi perhatian dalam penyebaran *Escherichia coli* penyandi gen ESBL walaupun medan dan jarak tempuh yang berat dalam penanganan kasus tersebut.

## **6.6 Keterbatasan Penelitian**

Penelitian ini mengalami keterbatasan dalam pengambilan sampel dalam situasi pandemik Covid-19.

## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai karakter Gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) *Escherichia coli* dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* di Pulau Lombok didapatkan kesimpulan antara lain;

1. *Escherichia coli* sebesar (22,7%) ditemukan dalam cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder*
2. *Escherichia coli* yang diisolasi dari cairan saluran reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* seluruhnya resisten terhadap antibiotik *Penicillin* (100%) dan yang resisten terhadap dua antibiotik *Penicillin* dan *Cefotaxime* sebanyak (60%)
3. Karakter Gen penyandi *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari *Escherichia coli* yang berasal dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* menunjukkan karakter gen *bla TEM* dan *blaCTX-M*.
4. *Phylogenetic tree Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dalam data di *GenBank* menunjukkan *Escherichia coli* penyandi gen *blaTEM* mempunyai kekerabatan dengan *Escherichia coli isolate GD8 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116 (blaTEM)*, dan *Escherichia coli strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM)* serta



*Escherichia coli* S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM 206, sedangkan untuk gen blaCTX-M mempunyai kekerabatan dengan *Escherichia coli* strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14.

## 7.2 Saran

1. Data tentang resistensi antibiotik dari *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Betalactamase* (ESBL) dapat dijadikan wacana dalam penggunaan antibiotik dalam pengobatan pada sapi Bali, khususnya kasus *repeat breeder* dengan memperhatikan anjuran pemerintah.
2. Karakter gen dan analisis *Phylogenetic tree Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) dari cairan reproduksi sapi Bali yang mengalami *repeat breeder* dapat dijadikan informasi dalam deteksi gen resistensi *Escherichia coli* pada sapi Bali dan dasar dalam penanggulangan ancaman resistensi antimikroba dengan pendekatan *One Health* dalamantisipasi penyebaran *Escherichia coli* penghasil *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL).
3. Perlu dilakukan penelitian dengan pendekatan *One Health* yang lebih lanjut mengenai karakter gen penyandi *Extended Spectrum Betalactamase* (ESBL) dari *Escherichia coli* dari aspek lingkungan, ternak dan manusia (peternak) disekitar peternakan sapi Bali.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, C., dan Debbie S.R. 2003. Deteksi Bakteri Patogen *Streptococcus pyogenes* dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR), *Jurnal Natur Indonesia* 6(1): 1-4.
- Adator, E. H., Narvaez-Bravo, C., Zaheer, R., Cook, S. R., Tymensen, L., Hannon, S. J., Booker, C. W., Church, D., Read, R. R., & McAllister, T. A. (2020). A One Health Comparative Assessment of Antimicrobial Resistance in Generic and Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* from Beef Production, Sewage and Clinical Settings. *Microorganisms*, 8(6), 885.
- Agrawal, S., Singh, A. P., Singh, R., Saikia, R., Choudhury, S., Shukla, A., Prabhu, S. N., & Agrawal, J. 2021. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from postpartum uterine infection in dairy cattle in India. *Veterinary world*, 14(1), 200–209. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.200-209> .
- Ambler, R. P. 1980. The structure of lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* 289:321–331.
- Aminuddi, S. P., Alpian, S. B., Dita, P and Kholik. 2020. Identification of gram-negative bacteria of Bali cattle with repeat breeder cases on East Lombok, West Nusa Tenggara Province *J. Phys.: Conf. Ser.* 1430 012013.
- Arthur, G.H., Noakes, R.J., Pierson, H.W., 2001. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.\
- AVMA. 2008. One health: A new professional imperative. One Health Initiative Task Force Final Report. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-Spectrum -Lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:933–951.
- Badan Pusat Statistika (BPS). 2020. Kabupaten Provinsi NTB Dalam Anagka. BPS Provinsi NTB.
- Badan Pusat Statistika (BPS). 2019. Kabupaten Lombok Tengah Dalam Anagka. BPS Kabupaten Lombok Tengah.
- Bush, K., and Singer, S. B. 1989. Biochemical Characteristics of Extended Broad Spectrum -Lactamases. *Infection*, 17:429–433.

- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. 1995. A functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:1211–1233.
- Bush, K., & Bradford, P. A. 2016.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W. P. 2015. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* 8, 240–245. <https://doi.org/10.1111/eva.12185>
- Chatrou, L.W., Pirie, M.D., Erkens, R.H.J., Couvreur, T.L.P., Neubig, K.M., Abbott, R.J., Mols, J.B., Maas, J.W., Saunders, R.M.K., Chase, M.W. 2012. A new subfamily and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Bot J Linn Soc* 169: 5-40.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. Healthcare Associated Infection: Laboratory Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs). Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100–S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cornelissen, C. N., Fisher, B. D. & Harvey R.A. 2013. Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. 3th. Philadelphia : *Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business*. p. 111-5.
- Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi NTB. 2015. Laporan Akhir Road Map Pengembangan Kawasan Peternakan Sapi Potong di Kabupaten Lombok Timur 2015-2019.
- Dibia, I.N., Dartini, N.L., Arsani, N.M. 2015. Gangguan Reproduksi Ternak Sapi di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat. *Buletin Veteriner, BBVet Denpasar*, Vol. XXVII, No. 87.
- Drieue L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology Infection Journal*, 14(1), pp. 90-103.
- Dohoo, I., Martin, W and Stryhn, H. 2009. *Veterinary Epidemiologic Research*, 2nd edition. AVC, Inc., Charlottetown, Canada.

- European Food Safety Authority (EFSA). 2011. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum-lactamases and/or AmpC-lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J.* **9**:1–95.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2016. Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production. Food & Agriculture Organization.
- Founou, L.L., Founou, R.C., Essack, S.Y. 2020. Antimicrobial Resistance in the Farm-To-Plate Continuum: More Than a Food Safety Issue. *Preprints*, 2020020309 doi: 10.20944/preprints202002.0309.v1.
- Gani, M.O., Amin, M.M., Alam M.G.S., Kayesh, M.E.H., Karim, M.R., Samad, M.A., Islam, M. 2008. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangl. J Vet Med* 6(1): 79–86.
- Guenther, S., Ewers, C., & Wieler, L. H. 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution?. *Frontiers in microbiology*, 2, 246. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00246>.
- Gunawan., Nurmayani, S., Mandrasari, J., Tirtasari, K., Kholik. 2018. Antimicrobialresistance of escherichiacolithat Isolated from Fecal samples of Bali Cattle at Local Farm on Lombok Island. *Jurnal Sangkareang* 4(3): 10-13.
- Hassuna, N.A., Khairalla, A.S., Farahat, E.M., Hammad, A.M., Abdel-Fattah, M. 2020. Molecular characterization of Extended-spectrum \_ lactamase-producing *E. coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt. *Sci. Rep*, 10, 1–8.
- Hawkey, P.M., & Jones, A.M. 2009. The Changing Epidemiology of Resistance. *J Antimicrob Chemother.* 64 Suppl., 1: 3–10.
- Huelsenbeck, J, P. & Hillis, D. M. 1993. Success of phylogenetic method in the four taxon case. *Systematics Biology*, 42, 247–264.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., & Piddock, L. J. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet (London, England)*, 387(10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0).
- Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T .1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> edition. Williams and Wilkins, Baltimore.

- Horton, R. A., Randall, L. P., Snary, E. L., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., Duncan, D., Rabie, A., McLaren, I., Watson, E., La Ragione, R. M., & Coldham, N. G. 2011. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3715–3719.
- Huang, L., Xu, Y., Xu, J., Ling, J., Zheng, L., Zhou, X., Xie, G. 2019. Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) by rainfall on a cyclic economic breeding livestock farm. *Int. Biodeter. Biodegr.* 138, 114–121.
- Igwe, J., Onaolapo, J., Kachallah, M., Nworie, A., Oladipo, H., Ojiego, B., Enose, O., Adeboye, S., Durowaiye, M., Akpa, A. and Ibanga, I. 2014. Molecular Characterization of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical *E. coli* Isolates. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 7, 276-285.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. 1995. Review of Medical Microbiology, 20th ed. Appellation and Lange, Norwalk, Connecticut, pp. 139–218.
- Joshi, S., Mudasir, M., Sharma, D., Saraswat, N. and Singh, R. 2013. Bacterial Microflora Associated with Repeat Breeding in Crossbred Dairy Cattle. *Indian Vet.J.* 90(6):52-54.
- Juliana, A., Hartono., M dan Suharyati, S. 2015. *Repeat Breeder* Pada Sapi Bali Di Kabupaten Pringsewu. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 3(2): 42-47
- Kamaruzzaman, E.A., Abdul Aziz, S., Bitrus, A.A., Zakaria, Z., Hassan, L. 2020. Occurrence and Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Dairy Cattle, Milk, and Farm Environments in Peninsular Malaysia. *Pathogens*, 9(12):1007. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121007>.
- Kress, W.J., Prince, L.M. & Williams, K.J. 2002, The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data, *Ann. J. Bot.* 89, 1682-1696.
- Lalitha, M. 2017. Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. Department of Microbiology Christian Medical College Vellore, Tamil Nadu.
- Lee, S., Teng, L., DiLorenzo, N., Weppelmann, T.A., Jeong, K.C. 2020. Prevalence and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum and AmpC  $\beta$ -Lactamase Producing *Escherichia coli* in Grazing Beef Cattle. *Front. Microbiol.* 10, 3076. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03076>.
- Luvsansharav, U.O., Hirai, I., Nakata, A., Imura, K., Yamauchi, K. 2012. Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M  $\beta$ -

- lactamaseproducing Enterobacteriaceae in rural Thai communities. *J Antimicrob Chemother* 67: 1769–1774.
- Melia, J., Amrozi, A., dan Tumbelaka, I.I.T.A. 2014. Dinamika Ovarium Sapi Endometritis Yang Diterapi Dengan *Gentamicine*, *Flumequine* Dan Analog Prostaglandin F2 Alpha (Pgf2 $\alpha$ ) Secara Intra Uterus. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 8(2), 111-115.
- Noakes, D.E., T. Parkinson, G.C.W. England, G.H. Arthur. 2009. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, ninth ed. Elsevier Sci. Ltd, 399- 408
- O'Neill, J. 2016. Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug resistant infections globally: final report and recommendations.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
- Purwantara, B., R. R. Noor, G. Andersson, & H. Rodriguez-Martinez. 2012. Banteng and Bali cattle in Indonesia: Status and forecasts. *Reprod. Domest. Anim.* 47(suppl.1):2–6.
- Qian, X., Gu, J., Sun, W., Wang, X., Su, J., Stedfeld, R. 2018. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. *J.Hazard. Mater.* 344, 716–722.
- Rafika, I., Thasmi, C.N., Herrialfian, Rosmaidar, dan Hafizuddin. 2020. Isolasi dan identifikasi bakteri gram negative pada uterus sapi aceh yang mengalami repeat breeding. *Jurnal Agrivet*, 20 (2): 187-192.
- Robinson, T. P., Wertheim, H. F., Kakkar, M., Kariuki, S., Bu, D., & Price, L. B. 2016. Animal production and antimicrobial resistance in the clinic. *Lancet (London, England)*, 387(10014), e1–e3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00730-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00730-8).
- Rustamadji, B., Ahmadi., Kustono., Sutarno, T. 2007. Kinerja usaha peternakansapi perah rakyat sebagai tulang punggung pembangunan persusuan nasional. Paper .Disampaikan pada Lokakarya Persusuan Nasional Yogyakarta. Dies 38 Fapet UGM.
- Satish, G. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan E. Suryawidjaja: The Short Textbook of Medical Microbiologi. Jakarta: Bina Rupa Aksara.
- Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N., Nash, D. M., & Herath, S. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 176(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>

- Sudarwanto, M.B., Lukman, D.W., Latif, H., Pisestyani, H., Sukmawinata, E., Akineden, O. 2016. CTXM producing *Escherichia coli* isolated from cattle feses in Bogor Slaughterhouse, Indonesia. *Asian Pac J Trop Biomed*, 6(7): 605-608.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S., 2011, MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods, *Molecular Biology and Evolution* 28(10), 2731-2739.
- Thalib, C., Entwistle, K., Siregar, A., Budiarti, S., and Lindsay, D. 2003. Survey of population and production dynamics of Bali cattle and existing breeding programs in Indonesia. *ACIAR Proceedings*, 3-9.
- Thomson, K.S., Sanders, C.C., Moland, E.S. 1992. Detection of extended spectrum  $\beta$  Lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* comparison of the double disk and three dimensional test. *Antimicrob Agents Chemother*, 36: 1877-82.
- Vandepitte, J., J. Verhaegen, K. Engbaek, P. Rohner, P. Piot, C.C. Heuck, 2003: *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*, 2nd ed., World Health Organization, Geneva
- van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2, 203.
- Wodaje, H.B., & Mekuria, T.A. 2016. Risk Factors of Repeat Breeding in Dairy Cattle. *Advances in Biological Research*, 10 (4): 213-221.
- Widodo, A, Effendi, M.H., Khairullah, A.R. 2020. Extended-spectrum betalactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from livestock. *Syst Rev Pharm* 11 (7): 382-392.
- Winarso, B. 2009. Pengembangan Ternak Sapi Potong dalam Mendukung Program Pengembangan Swasembada Daging di Nusa Tenggara Barat. ICASEPS Working Paper No.98. Pusat Analisis Sosial Ekonomi dan Kebijakan Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian.
- Wu, G., Day, M.J., Mafura, M.T., Nunez-Garcia, J., Fenner, J.J., et al. 2013. Comparative Analysis of ESBL-Positive *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans from the UK, The Netherlands and Germany. *PLOS ONE* 8(9): e75392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075392>

- Xia, S., Fan, X., Huang, Z., Xia, L., Xiao, M., Chen, R., Xu, Y., Zhuo, C. 2014. Dominance of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolated from Patients with Community-Onset and Hospital-Onset Infection in China. PLOS ONE 9(7): e100707.
- Yang, F., Zhang, S.D., Shang, X.F., Wang, X.R., Wang, L., Yan, Z.T., Li, H.S. 2018. Prevalence and characteristics of extended spectrum  $\beta$ -Lactamase - producing *Escherichia coli* from bovine mastitis cases in China. J. Integr. Agric. 17: 1246–1251.
- Yuwono. 2011. The Prevalence of TEM Gens on Extended-Spectrum BetaLactamases Producing Enterobacteriaceae. J. Kedokteran dan Kesehatan, 1:3098-3102.
- Vandepitte, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., Heuck, C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology 2nd ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42696>
- Winarso. 2009. Pengembangan Ternak Sapi Potong dalam Mendukung Program Swasembada Daging di Nusa Tenggara Barat. ICASEPS Working Paper No.8.
- Woolhouse, M. E., Ward, M. J. 2013 Sources of antimicrobial resistance. Science 341, 1460 – 1461.
- Woolhouse, M., Ward, M., Van Bunnik, B., Farrar, J. 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Phil. Trans. R. Soc. B 370, 20140083 (10.1098/rstb.2014.0083).

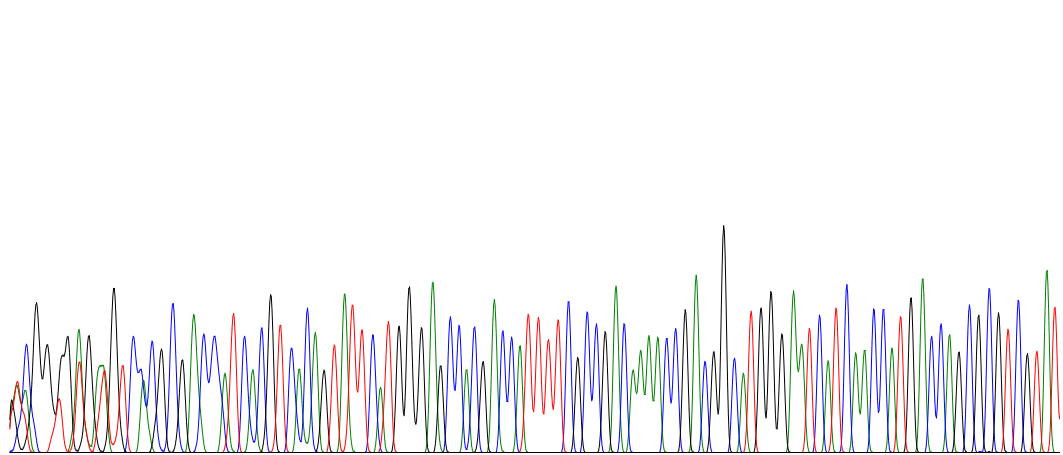


## Lampiran 1. Hasil Kromatogram gen CTX-M dan TEM

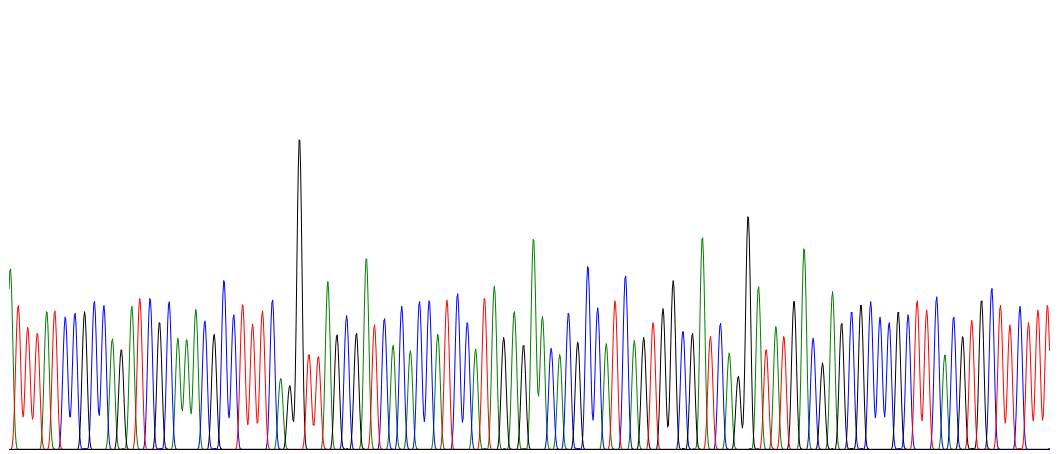
### CTX-M

#### 1R

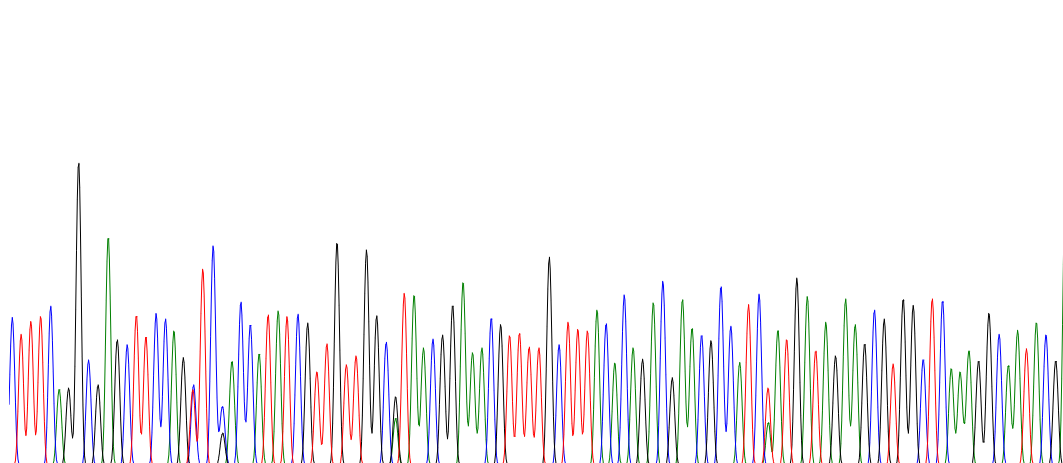
NCGGGGAGATGTCAAGCGACCATCACGTCAAGTATTGATGGGAGCCACGACCATTTTCGGGACAAAACGGACGGCATGGGAATCATCAACCATGACCAAGCGGTCGTAT



ATTTATCCGGCAGATCGCAACGCCCTTTCAGGTTAGCGATCACACCATCCATAGAAACACGCCATCAGTGGCGATCAGGATATGACGAGCGCCCGCTTCAAGTGGCTT

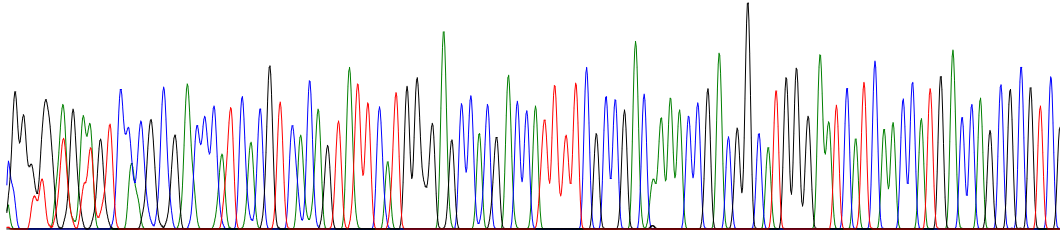


CTTTCAGGCGAGCTTCCAGCTCCACCATATCGTTGTTGGGTAAACGGAAACGTTTTGCTTTACACAGACGAACGCCATCTATGATAGAAGCGTGGCTCAAAGGCAATACGA

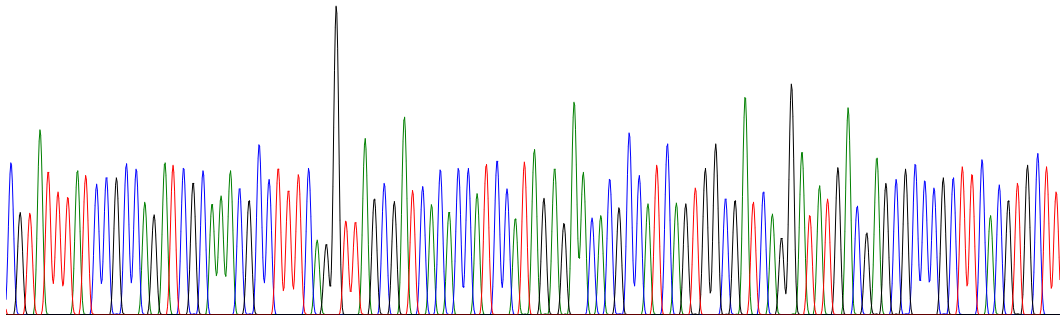


## 2R

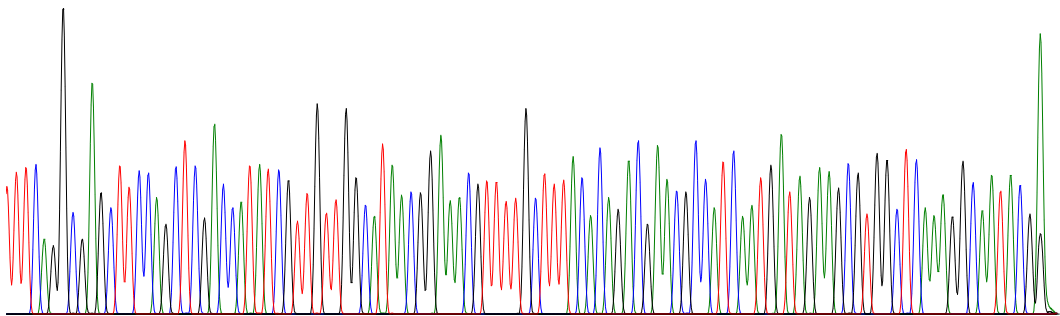
GGCTGGAGATGTCACGCGACCCATCACGTCACAGTATTTCATGGGAGCCACGACCATTTCGCCGACAAAACCGACGGCATGGGAATCATCAACCATGACCAGCGGTCC



CGTATTTATCCGCCAGATCGCAAACGCCCTTTCAGGTTAGCGATCACACCATTCCATAGAGAACACGCCATCAGTGGCGATCAGGATATGACGAGCGCCCGCTTCACGTGCTT

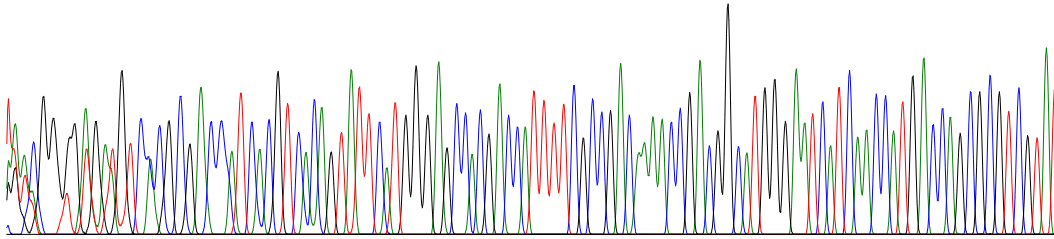


TTTCAGGCCGAGCTTCAGCTCGACCATATCGTTGTTGGCATAACGGAAACGTTTTGCTTTACACAGACGAAACCCATCAATGATAGAAAGCGTGGCTCAAAGGCAATACGA

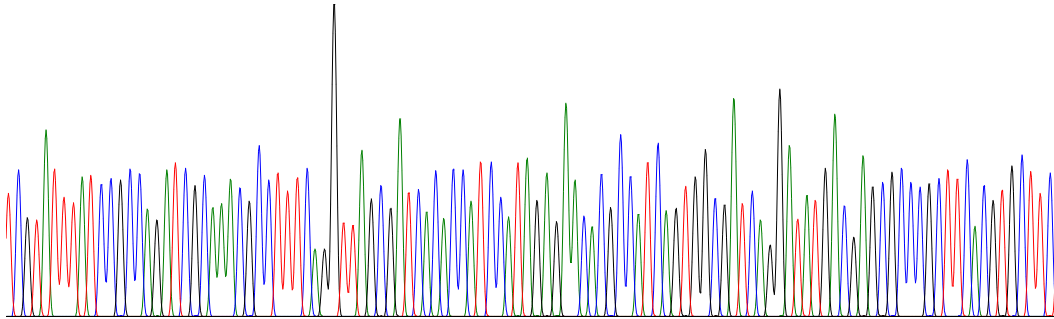


## 5R

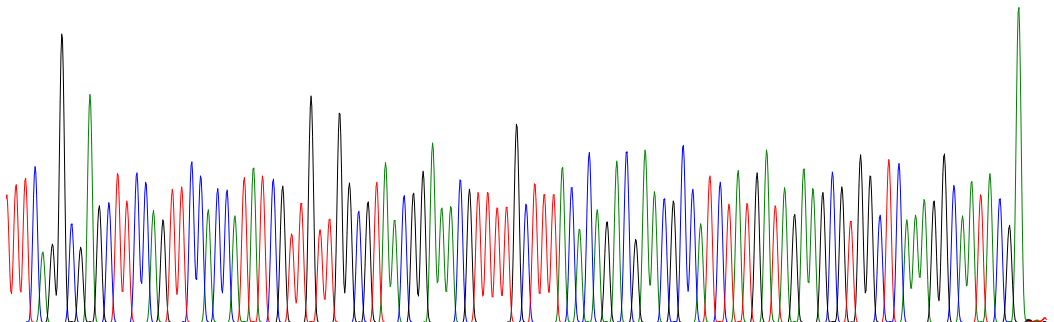
ANCGGGGAGATGTCACGCGACCATCACGTCAAGTATCATGGGAGCCACGACCATTTTCGCCGACAAACCGACGGCATGGGAATCATCAACCATGACCAGCGCGTCTGTAT



TCGTATTTTCCGCCAGATCGCAAAAGCCCTTCAGGTTAGCGATCACACCATCCATAGAGAACACGCCATCAGTGGCGATCAGGATGACGAGCCCGCTTCACGTGCTTC

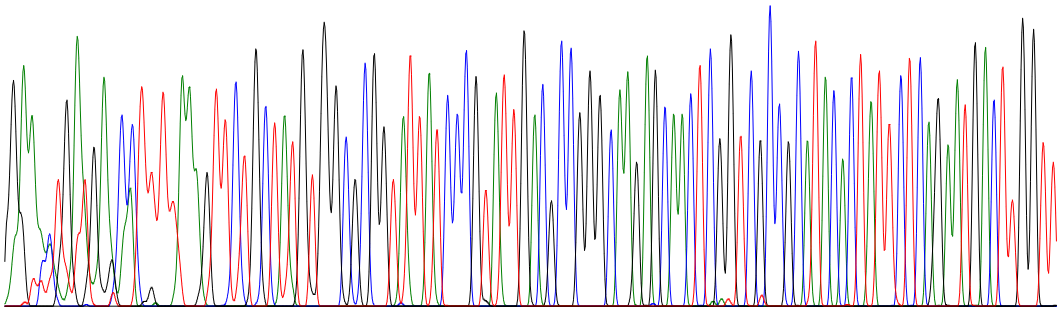


TTTCAGGCCGAGCTTCCAGTCCACCATATCGTTGTGGCGTAACGGAACGTTTGGCTTACACAGACGAAACGCCATCTATGATAGAAAGCGTGGCTCAAAGGCAATACGAA

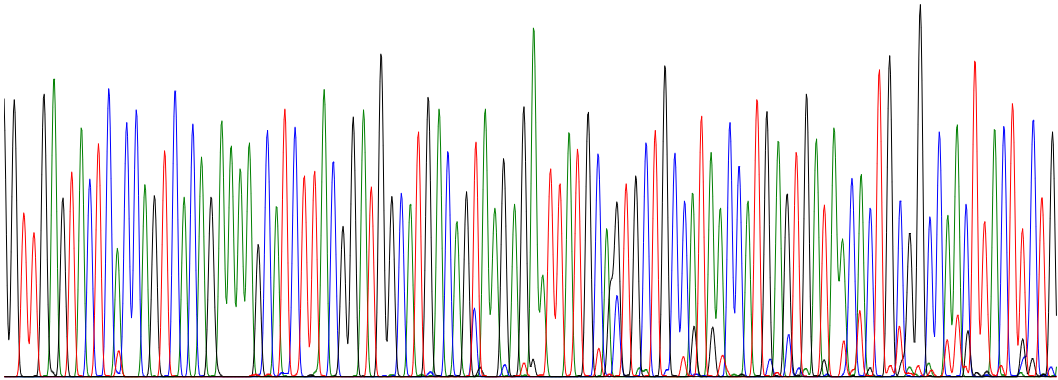


**TEM****1R**

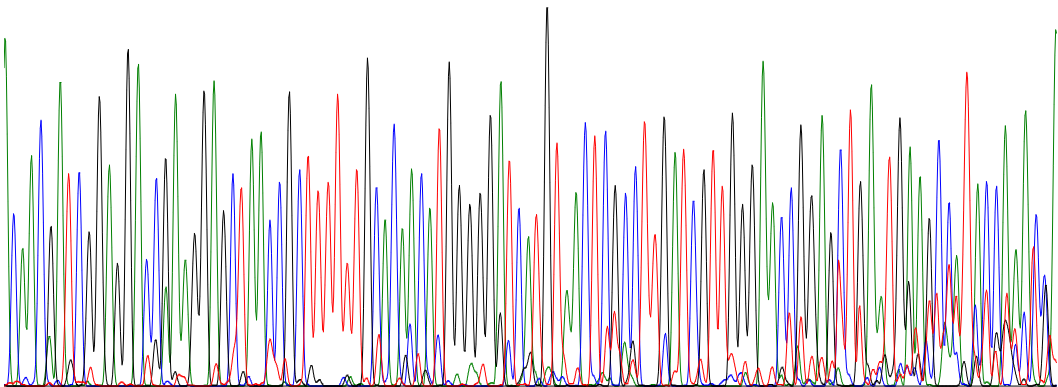
G A A N C T G A T T G A G C C C T T T T A A A G T T C T G C T A T G T G G C G C G G T A T T A T C C C G T A T T G A C G C C G G G C A A G A G C A A C T C G G T C G C C G C A T A C A C T A T T C T C A G A A T G A C T T G G T T

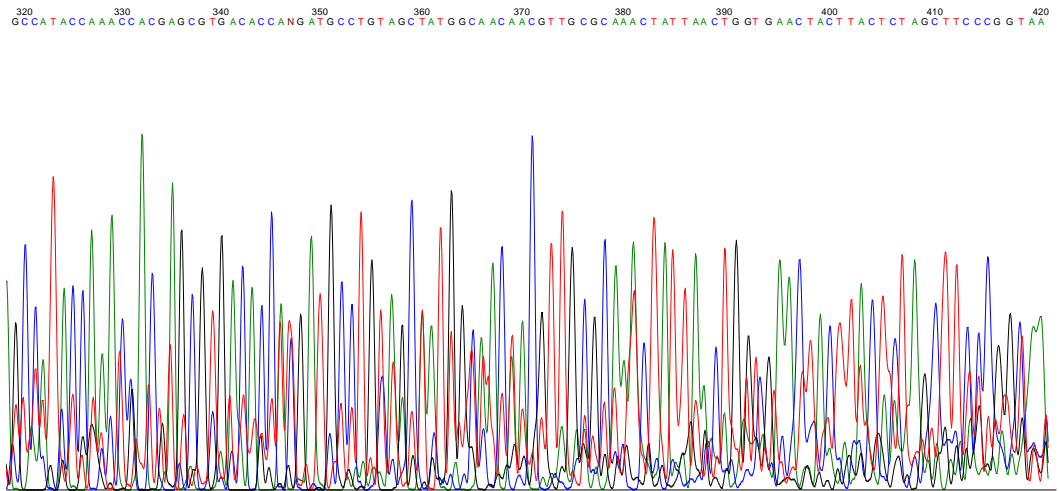


G T T G A G T A C T C A C C A G T C A C A G A A A G C A T C T T A C G G A T G G C A T G A C A G T A A G A G A A T T A T G C A G T G C T G C C A T A A C C A T G A G T G A T A A C A C T C G G G C C A A C T T A C T T C T G

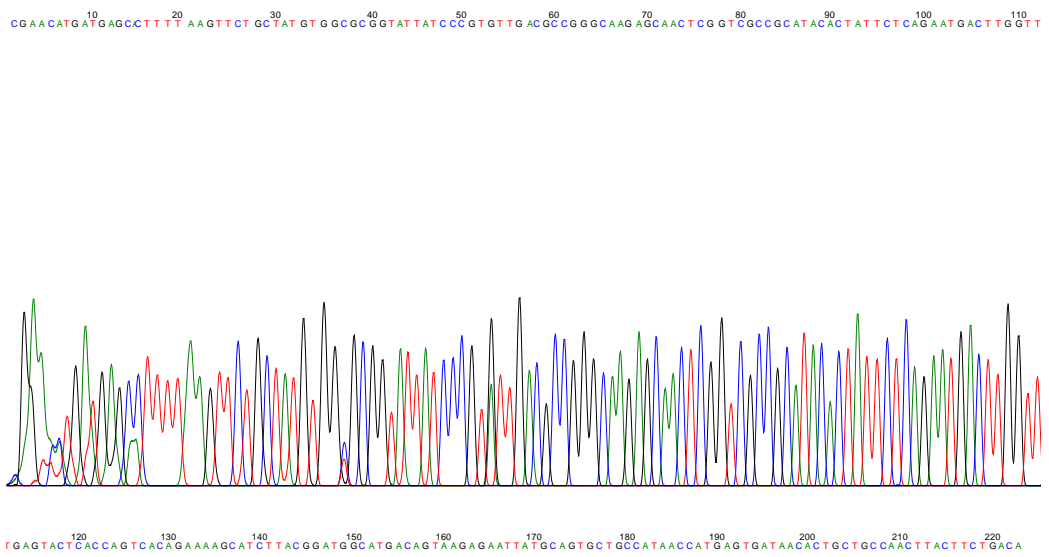


C A A C G A T C G G A G G A C C G A A G G A G C T A A C C G C T T T T T G C A C A A C A T G G G G A T C A T G T A A C T C G C C T T G A T C G T T G G A A C C G G A G C T G A A T G A A G C C A T A C C A A A C C A

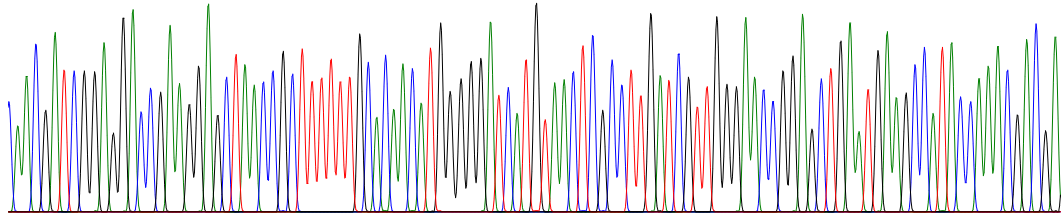




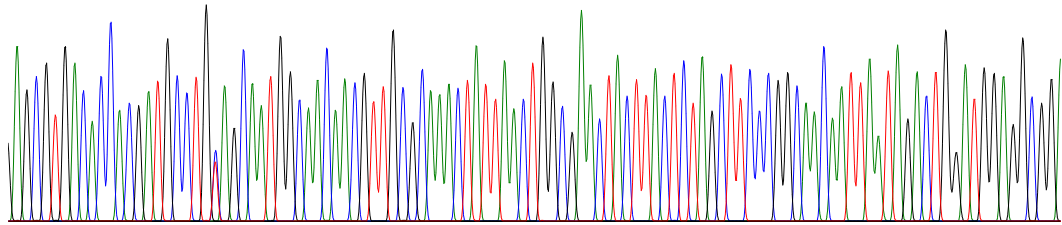
## 2R



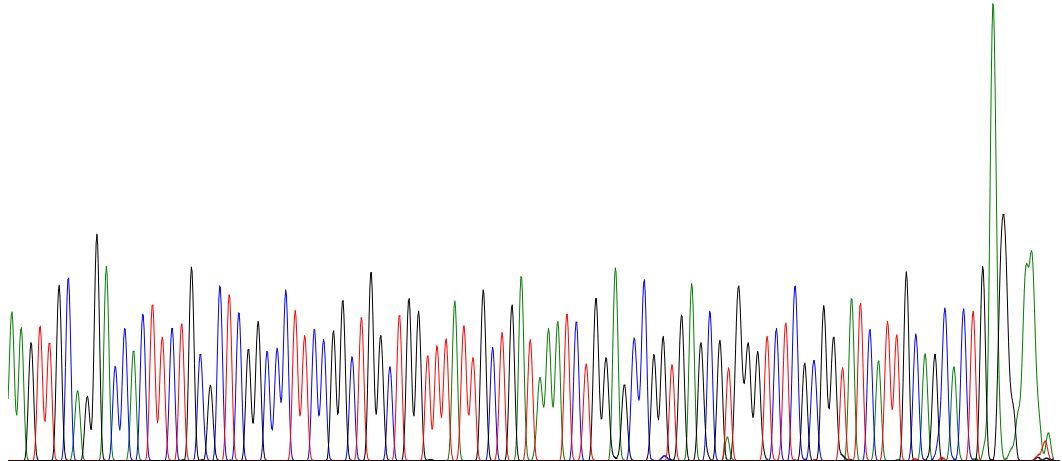
>AACGATC<sup>230</sup>GGAGGACC<sup>240</sup>GAAGGAGCTAAC<sup>250</sup>CGCTTTTT<sup>260</sup>GACAAACATGGGGATCATG<sup>270</sup>TAACTCGCCTT<sup>280</sup>GATCGTTGG<sup>290</sup>AAACCGGAGCTGA<sup>300</sup>AATGAA<sup>310</sup>GCCATACCA<sup>320</sup>AAACGACGA<sup>330</sup>



AGCGTGACACACGAT<sup>340</sup>TGCTGCAGCAAT<sup>350</sup>GGCAACAAC<sup>360</sup>TTCGGCAAACT<sup>370</sup>TAACTGGCGAACT<sup>380</sup>TACTCTAGCT<sup>390</sup>CCGGCAACA<sup>400</sup>TTAATAG<sup>410</sup>ACTGGATGGAGCGG/

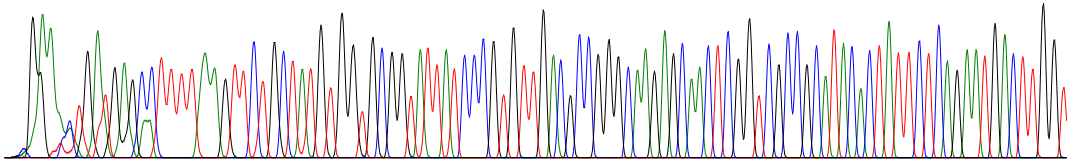


AAGTTGCAGGACC<sup>450</sup>ACTTCTGC<sup>460</sup>GCTCGGCCCT<sup>470</sup>CCGGCTGGCT<sup>480</sup>GTTTATTGCT<sup>490</sup>GATAAATC<sup>500</sup>TGGAGCCGGT<sup>510</sup>GAGCGTGGG<sup>520</sup>CTCGCGGTAT<sup>530</sup>CATTGCAGCA<sup>540</sup>TGAGGAA

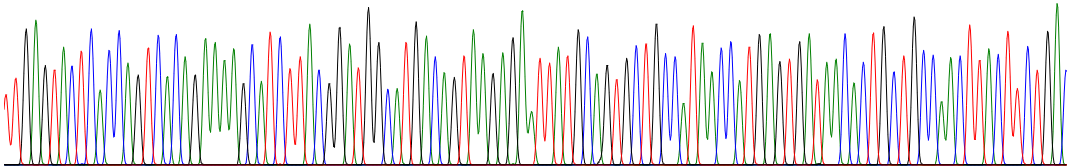


## 5R

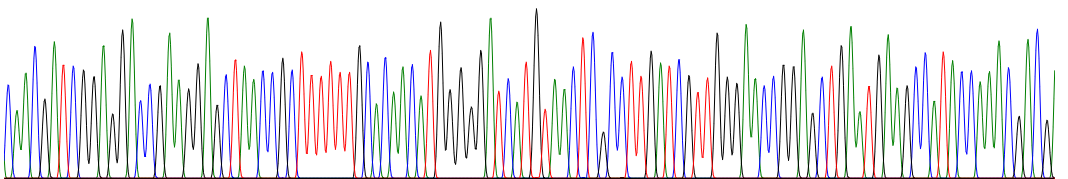
ACGAAAC<sup>10</sup>TG<sup>20</sup>ATGAGAC<sup>30</sup>TT<sup>40</sup>TAAGTT<sup>50</sup>CT<sup>60</sup>GCTAT<sup>70</sup>GTGG<sup>80</sup>GTGCGG<sup>90</sup>TATT<sup>100</sup>AT<sup>110</sup>CCCG<sup>120</sup>TG<sup>130</sup>TGAC<sup>140</sup>GCCGGG<sup>150</sup>CAAG<sup>160</sup>AGCA<sup>170</sup>ACTCG<sup>180</sup>GTC<sup>190</sup>GCCGC<sup>200</sup>AT<sup>210</sup>ACACT<sup>220</sup>ATT<sup>230</sup>CT<sup>240</sup>CAGA<sup>250</sup>AT<sup>260</sup>GACT<sup>270</sup>TT<sup>280</sup>G<sup>290</sup>GT



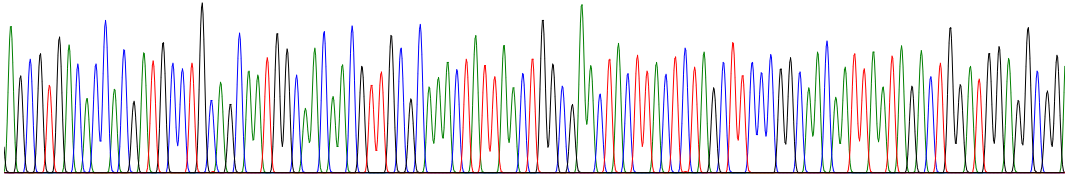
TT<sup>120</sup>GAG<sup>130</sup>TACT<sup>140</sup>CACCA<sup>150</sup>GT<sup>160</sup>CACAG<sup>170</sup>AAAAG<sup>180</sup>CAT<sup>190</sup>CTT<sup>200</sup>ACGG<sup>210</sup>GAT<sup>220</sup>GCC<sup>230</sup>AT<sup>240</sup>GACA<sup>250</sup>GT<sup>260</sup>AAAGAGA<sup>270</sup>ATT<sup>280</sup>AT<sup>290</sup>GCA<sup>300</sup>GT<sup>310</sup>GCT<sup>320</sup>GCC<sup>330</sup>ATA<sup>340</sup>ACC<sup>350</sup>AT<sup>360</sup>GAG<sup>370</sup>TGAT<sup>380</sup>AAC<sup>390</sup>ACT<sup>400</sup>GCT<sup>410</sup>GCCA<sup>420</sup>ACT<sup>430</sup>TACT<sup>440</sup>TT<sup>450</sup>CT<sup>460</sup>GAC



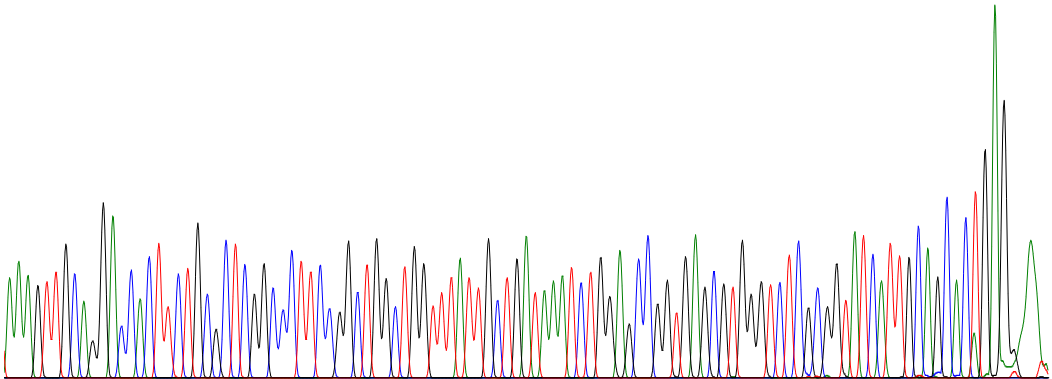
CAAC<sup>230</sup>GAT<sup>240</sup>CGGAG<sup>250</sup>GACC<sup>260</sup>GAAGG<sup>270</sup>AGCT<sup>280</sup>TAACC<sup>290</sup>CGCT<sup>300</sup>TTTT<sup>310</sup>TT<sup>320</sup>GCA<sup>330</sup>CAAC<sup>340</sup>AT<sup>350</sup>GCGG<sup>360</sup>GAT<sup>370</sup>CAT<sup>380</sup>GT<sup>390</sup>AAC<sup>400</sup>TC<sup>410</sup>GC<sup>420</sup>CT<sup>430</sup>TGAT<sup>440</sup>CG<sup>450</sup>TT<sup>460</sup>GGA<sup>470</sup>AAC<sup>480</sup>CGG<sup>490</sup>AGCT<sup>500</sup>GAA<sup>510</sup>TGAA<sup>520</sup>GCC<sup>530</sup>AT<sup>540</sup>ACCA<sup>550</sup>AAC<sup>560</sup>GACG



340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440  
A G C G T G A C A C C A C G A T G C C T G C A G C A A T G G C A A C A C G T T G C G C A A A C T A T T A A C T G G C G A A C T A C T T A C T C T A G C T T C C C G G C A A C A A T T A A T A G A C T G G A T G G A G G C G G



450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550  
A A A G T T G C A G G A C C A C T T C T G C G C T C G G C C C T T C C G G C T G G T G G T T A T T G C T G A T A A A T C T G G A G C C G G T G A G C G T G G G T C T C G C G G T A T C A T T G C A G C A C T G A G G A A





## Lampiran 2. Dokumentasi Proses Penelitian




### 1. Proses Pengambilan Sampel

		
Persiapan alat dan bahan	Pemeriksaan sapi yang dilanjutkan pengambilan cairan reproduksi	Pengguntingan ujung plastik sheet pada Media BHI






### 2. Kultur bakteri *E. coli*

		
Persiapan alat dan bahan	Kultur <i>E. coli</i> pada Media EMBA	Uji biokimia



### 3. Uji kepekan isolat *E. coli* terhadap antibiotik

		
Pemasangan cakram antibiotik pada media MHI	Inkubasi sampel	Penilaian resistensi





#### 4. Ekstraksi DNA *E. coli*

No.	Dokumentasi	Keterangan
1		Sampel dimasukkan ke dalam <i>microcentrifuge tube</i>
2		Buffer ATL dimasukkan ke dalam <i>microcentrifuge tube</i>
3		Buffer AE dimasukkan ke dalam <i>microcentrifuge tube</i>
4		Buffer AL dimasukkan ke dalam <i>microcentrifuge tube</i>
5		Sampel dari <i>microcentrifuge tube</i> ke dalam QIAmp Mini Spin Column

## 5. Proses PCR

No.	Dokumentasi	Keterangan
1		Program amplifikasi
2		Sampel dimasukkan pada mesin PCR untuk amplikasi

## 6. Proses Elektroforesis

No.	Dokumentasi	Keterangan
1		GeneRuler dimasukkan pada sumuran pertama
2		Sampel DNA dimasukkan pada tiap sumuran agar
3		Elektroferesis dilakukan selama 35 menit
4		Pembacaan gel hasil elektroforesis dengan <i>Gel Imager</i>

**Lampiran 3. Primer yang digunakan dan referensi**

<b>Primer – Gen Resisten</b>	<b>Amplikon size (ukuran bp)</b>	<b>Urutan Basa Nuceotida</b>	<b>NCBI Reference Sequence</b>
bla-TEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206	581	Primer F: TCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC	NG_050238.1
		Primer R: CAGTGCTGCAATGATACCGC	
EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14	579	Primer F: CTTTATGCGCAGACGAGTGC	KX669628.1
		Primer R: CGTATTGCCTTTGAGCCACG	
MLI extended-spectrum beta-lactamase VEB-8 gene	568	Primer F: CATTTCCTCGATGCAAAGCGT	JX679208.1
		Primer R: TAGTGGCTGCTGCAATTCCA	

#### Lampiran 4. Sekuan referensi yang digunakan dalam analisis phylogenetic

##### 1. *Escherichia coli* S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206, complete CDS

>NG\_050238.1 *Escherichia coli* S2.2-EK pEC-S2.2 blaTEM gene for class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-206, complete CDS

```

ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCACCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTC
ACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT
AAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATAC
ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC
TCACTGATTAAGCATTGGTAA

```

2. *Escherichia coli* strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-14 allele, partial cds

GenBank: KX669628.1

```
>KX669628.1 Escherichia coli strain EC271 extended spectrum
beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-14 allele,
partial cds
AAGAGAGTGAACGGATGATGTTTCGCGGGCGGGCGTGCATTCCGCTGCTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTT
ATGCGCAGACGAGTGCAGTGCAGAAAAGCTGGCGGGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGT
CGCGCTCATCGATAACCGCAGATAATACGCAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCAGT
ACCAGTAAAGTTATGGCGGCCGCGGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGAAAAGCAGCTGCTTAATCAGC
CTGTTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTCAACGGCACAAT
GACGCTGGCAGAAGTACGCGCGGCCGCGTTCAGTACAGCGACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCC
CAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGGATCGGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATC
GCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCGCGGGACCCGAGAGACACCACCAGCCGCGGGCGATGGC
GCAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGTTCATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGG
CTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTCGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACTGTGGGTGATA
AGACCGGCAGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGCCGAGGGTTCGTGCCCGCT
GGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCAGAGAGCCGCCGCGATGTGCTGGCTTCAGCG
GCGAGAATCATCGCCGAAGGGCTGTAAAA
```

## 3. GenBank: MT387477.1

ORGANISM *Escherichia coli*

AUTHORS wang,Y., Zhou,J., Li,X., Ma,L., Cao,X., Hu,W., Zhao,L.,  
Jing,W.,

Lan,X., Li,Y., Gong,X., Chen,Q., Stipkvits,L., Szathmary,S., Tarasiuk,K.,  
Pejsak,Z. and Liu,Y.

TITLE Genetic Diversity, Drug Resistant and ESBL types of *Escherichia coli* isolates from Chicken, dogs, swine and Yaks in Gansu and Qinghai provinces

JOURNAL Unpublished

```
>MT387477.1 Escherichia coli isolate GD8 class A broad-spectrum beta-
lactamase TEM-116 (blaTEM) gene, blaTEM-116 allele, complete cds
ATGAGTATTC AACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTGTTTTGCTC
ACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT
AAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATAC
ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
AAGAGAATTTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAAC TATTAAC TGCGA AACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
GCGGATAAAGTTGCAGGACC ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC
TCACTGATTAAGCATTGGTAA
```



4. LOCUS MG653169 861 bp DNA  
ORGANISM *Escherichia coli*  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
Enterobacteriaceae; Escherichia.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 861)  
AUTHORS Siddiqui,M.T., Sultan,I. and Haq,Q.M.R.  
TITLE Studies on CTX-M type Extended Spectrum beta-Lactamases  
producing bacterial isolates from Delhi stretch of river Yamuna

```
>MG653169.1 Escherichia coli strain SRT41 extended spectrum beta  
lactamase (TEM) gene, TEM-116 allele, complete cds  
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTGCTC  
ACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT  
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT  
AAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATAC  
ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT  
AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC  
GGAGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGG  
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTAGCAATGGCAACAAC  
GTTGCGCAAACTATTAACGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG  
GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG  
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT  
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC  
TCACTGATTAAGCATTGGTAA
```

5. LOCUS MT789719 861 bp DNA  
 DEFINITION *Escherichia coli* strain 270477-1 class A broad-spectrum  
 beta-lactamase TEM-1 (*bla*TEM) gene, *bla*TEM-1 allele, complete cds.  
 AUTHORS Baldo,V., Salogni,C., Giovannini,S., D'Incau,M., Boniotti,M.B.,  
 Birbes,L., Pitozzi,A., Formenti,N., Grassi,A., Pasquali,P. and  
 Alborali,G.L.  
 TITLE Pathogenicity of Shiga toxin type 2e *Escherichia coli* in pig  
 colibacillosis  
 JOURNAL *Front Vet Sci* (2020) In press

```
>MT789719.1 Escherichia coli strain 270477-1 class A broad-spectrum
beta-lactamase TEM-1 (blaTEM) gene, blaTEM-1 allele, complete cds
ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTC
ACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT
AAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATAC
ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACCTATTAACGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC
TCACTGATTAAGCATTGGTAA
```

6. LOCUS KX871187 712 bp DNA  
 DEFINITION *Escherichia coli* strain 36-A extended spectrum beta-lactamase (blaTEM) gene, partial cds.  
 AUTHORS Jena,J., Sahoo,R.K., Gaur,M. and Debata,N.K.  
 TITLE Genetic characterization of ESBL producing multidrug resistant gram-ve bacteria  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 712)  
 JOURNAL Submitted (21-SEP-2016) Center of Biotechnology, Siksha 'O' Anusandhan University, Near SUM Hospital, Kalinga Nagar, Ghatikia, Bhubaneswar, Odisha 751003, India

```
>KX871187.1 Escherichia coli strain 36-A extended spectrum beta-lactamase
(blaTEM) gene, partial cds
TTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTG
CACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACG
TTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAA
GAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGC
ATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGC
CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCAT
GTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCGTGATGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGC
TGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAG
ATGGTAAGCCCT
```

7. LOCUS KU662381 783 bp DNA  
 DEFINITION *Escherichia coli* strain W21 TEM beta-lactamase gene,partial cds.  
 ACCESSION KU662381  
 ORGANISM *Escherichia coli*  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
 Enterobacteriaceae; *Escherichia*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 783)  
 AUTHORS Rhetso,K., Ghatak,S., Kumar,A., Bhatta,R.S., Kanojiya,S.,  
 Sarkar,J., Purkait,D., Bhattacharjee,U., Ahuja,A., Das,S.,  
 Sanjukta,R.K., Puro,K., Mawlong,M., Shakuntala,I., Sen,A.,  
 Pattanayak,A., Ngachan,S.V., Dey,T.K., Chakraborty,A.,  
 Mukherjee,P., Karam,A., Vise,E. and Pegu,R.  
 TITLE Beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from India  
 JOURNAL Unpublished

>KU662381.1 *Escherichia coli* strain W21 TEM beta-lactamase (blaTEM) gene,  
 partial cds

```

CGGCATTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTG
AAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTT
TCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAC
CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAG
TGATAAAGTGCAGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAC
AACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCTTGGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACG
AGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAAGTGGCGAACTACTTAC
TCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCG
GCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTG
CAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT
GGATGAACGAAAT

```

8. LOCUS KP308219 588 bp DNA  
 DEFINITION *Escherichia coli* strain RIGLD-1B9-F1 beta-lactamase TEM-1 gene, partial cds.  
 SOURCE *Escherichia coli*  
 ORGANISM [Escherichia coli](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; *Escherichia*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 588)  
 AUTHORS Doregiraee,F., Alebouyeh,M., Nayeri Fasaeei,B., Tajeddin,E. and Charkhkar,S.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (22-DEC-2014) Research Center for Gastrointestinal Foodborne Diseases, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Yemen Street, Velenjak, Tehran 198835187, Iran

```
>KP308219.1 Escherichia coli strain RIGLD-1B9-F1 beta-lactamase TEM-1
gene, partial cds
CTTTTGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCC
CGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGAC
GCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA
CACTGCGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATG
GGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTG
ACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGC
TTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTT
CCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAAT
```

## 9. LOCUS KY640457 723 bp DNA

DEFINITION *Escherichia coli* strain E9ECMO class A broad-spectrum  
beta-lactamase TEM-1 (blaTEM-1) gene, partial cds.

ACCESSION KY640457

VERSION KY640457.1

AUTHORS Helmy,O.M. and Kashef,M.T.

TITLE Different phenotypic and molecular mechanisms associated with  
multidrug resistance in Gram-negative clinical isolates from Egypt

JOURNAL Infect Drug Resist 10, 479-498 (2017)

PUBMED [29263684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29263684/)

JOURNAL Submitted (19-FEB-2017) Microbiology & Immunology, Faculty of Pharmacy,  
Cairo University, Kasr El Eini Street, Cairo 11562, Egypt

```
>KY640457.1 Escherichia coli strain E9ECMO class A broad-spectrum
beta-lactamase TEM-1 (blaTEM-1) gene, partial cds
GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATC
TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTAT
TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGC
GCAAACTATTAAGTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGA
TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
TCTACACGACGGGGAGTCAGGCA
```

10. LOCUS MW183893 827 bp DNA  
 DEFINITION *Escherichia coli* strain U-10 TEM family beta-lactamase (blaTEM) gene,  
 partial cds.  
 AUTHORS Datt,T., Datt,S., Singh,N.P. and Gandhoke,I.  
 TITLE Surveillance of MDR *Escherichia coli* strains producing TEM in Urine  
 and Stool isolates from Delhi & NCR  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 827)

```
>MW183893.1 Escherichia coli strain U-10 TEM family beta-lactamase
(blaTEM) gene, partial cds
CCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGA
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT
CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTG
TTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTGGTTGAGTACTCACC
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGT
GATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACA
ACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGA
GCGTGACACCACGATGCCGTCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACT
CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG
CCCTTCCGGTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGC
AGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATG
GATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA
```

11. LOCUS MW183897 835 bp DNA  
DEFINITION *Escherichia coli* strain U-14 TEM family beta-lactamase (blaTEM)  
gene, partial cds.  
ACCESSION MW183897  
AUTHORS Datt,T., Datt,S., Singh,N.P. and Gandhoke,I.  
TITLE Surveillance of MDR *Escherichia coli* strains producing TEM in Urine  
and Stool isolates from Delhi & NCR  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 835)

```
>MW183897.1 Escherichia coli strain U-14 TEM family beta-lactamase  
(blaTEM) gene, partial cds  
CCTTTTTTGCAGCATTTCCTGCTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGA  
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT  
CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTG  
TTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACC  
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTCTGCCATAACCATGAGT  
GATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACA  
ACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGA  
GCGTGACACCACGATGCCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACT  
CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG  
CCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGC  
AGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATG  
GATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA
```



12. LOCUS KP634884 740 bp DNA linear  
 DEFINITION *Escherichia coli* strain RIGLD-1B12-F2 TEM-116 (tem-116)gene,  
 partial cds.  
 AUTHORS Doregirae,F., Alebouyeh,M., Nayeri Fasaei,B., Tajeddin,E. and  
 Charkhkar,S.  
 TITLE *Escherichai coli* from poultry  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 740)  
 AUTHORS Doregirae,F., Alebouyeh,M., Nayeri Fasaei,B., Tajeddin,E. and  
 Charkhkar,S.

```
>KP634884.1 Escherichia coli strain RIGLD-1B12-F2 TEM-116 (tem-116)
gene, partial cds
ACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT
GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG
GCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCT
GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACAAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAA
TGGCAACAACGTTGCGCAAATTAATACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGA
CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCATTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT
GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT
CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAG
```

13. LOCUS AY265887 729 bp DNA linear  
DEFINITION *Escherichia coli* beta-lactamase (blaTEM) gene, blaTEM-116 allele, partial cds.  
AUTHORS Obert,C.A., Goldstone,C.M., Gordon,D.M. and Riley,M.A.  
TITLE Novel beta-lactamase isolated from wild Australian enteric isolates  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 729)

```
>AY265887.1 Escherichia coli beta-lactamase (blaTEM) gene, blaTEM-116
allele, partial cds
ATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGT
GCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAC
GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCA
AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAG
CATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGG
CCAATTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCA
TGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACG
ATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGG
AACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGG
CTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCA
GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTAT
```

14. LOCUS KX669628 869 bp DNA linear  
 DEFINITION *Escherichia coli* strain EC271 extended spectrum beta-lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-14 allele, partial cds.  
 AUTHORS Guggiana-Nilo,P., Lima,C.A., Cid-Maldonado,N., Dominguez-Yevenes,M., Mella-Montecinos,S., Garcia-Canete,P., Labarca-Labarca,J., Gonzalez-Rocha,G. and Bello-Toledo,H.  
 TITLE Identification of allelic variants of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Chile  
 JOURNAL Unpublished

```
>KX669628.1 Escherichia coli strain EC271 extended spectrum beta-
lactamase CTX-M-14 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-14 allele, partial cds
AAGAGAGTGCAACGGATGATGTTTCGCGGGCGGGCGTGCATTCCGCTGCTGCTGGGCAGCGCGCGCTTT
ATGCGCAGACGAGTGCGGTGCAGCAAAAGCTGGCGGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGT
CGCGCTCATCGATAACGCAGATAATACGCAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCAGT
ACCAGTAAAGTTATGGCGGCCGCGGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGCTGCTTAATCAGC
CTGTTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTCAACGGCACAAT
GACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTCAGTACAGCGACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCC
CAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATC
GCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCCCGGCGACCCGAGAGACACCACCACGCCGCGGGCGATGGC
GCAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGTTCATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGG
CTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTCGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACTGTGGGTGATA
AGACCGGCAGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGCCGCAGGGTCGTGCGCCGCT
GGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCAGAGAGCCGCCGCGATGTGCTGGCTTCAGCG
CGGAGAATCATCGCCGAAGGGCTGTAAAA
```

**Lampiran 5. Aligment blaTEM *E. coli* sampel dengan referensi NG\_050238.1**

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50
NG_050238. ATGAGTATTC AACATTTTCG TGTCACCCTT ATCCCTTTT TTGCGGCATT
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      60      70      80      90     100
NG_050238. TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      110     120     130     140     150
NG_050238. CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      160     170     180     190     200
NG_050238. AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210     220     230     240     250
NG_050238. GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGTGC GGTATTATCC CGTGTGACG
1R-T_TEM -----GATT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG
2R-T_TEM -----CGTTT TAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTGTGACG
5R-T_TEM -----ATTTT AAAGTTCTGC TATGTGGTGC GGTATTATCC CGTGTGACG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      260     270     280     290     300
NG_050238. CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
1R-T_TEM CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
2R-T_TEM CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
5R-T_TEM CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      310     320     330     340     350
NG_050238. GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
1R-T_TEM GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
2R-T_TEM GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
5R-T_TEM GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      360     370     380     390     400
NG_050238. AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCA- --TGAGTGAT AACACTGCTG
1R-T_TEM AAGAGAATTA TGCAGTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CAC-CAGTCA
2R-T_TEM AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCA- --TGAGTGAT AACACTGCTG
5R-T_TEM AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCA- --TGAGTGAT AACACTGCTG

```

```

                                410         420         430         440         450
NG_050238.  CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT
1R-T_TEM     CAGAAAAGCA TCTTACG--G ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTT
2R-T_TEM     CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT
5R-T_TEM     CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                460         470         480         490         500
NG_050238.  TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGGA
1R-T_TEM     TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGGA
2R-T_TEM     TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGGA
5R-T_TEM     TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGGA

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                510         520         530         540         550
NG_050238.  GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCTGCAG
1R-T_TEM     GCTGAATGAA GCCATACCAA ACCACGAGCG TGACACCA?G ATGCCTGTAG
2R-T_TEM     GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCTGCAG
5R-T_TEM     GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCTGCAG

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                560         570         580         590         600
NG_050238.  CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACATATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA
1R-T_TEM     CTATGGCAAC AACGTTGCGC AAACATATTAA CTGGTGAAct ACTTACTCTA
2R-T_TEM     CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACATATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA
5R-T_TEM     CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACATATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                610         620         630         640         650
NG_050238.  GCTTCCCGGC AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG
1R-T_TEM     GCTTCCCGGT AA-----
2R-T_TEM     GCTTCCCGGC AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG
5R-T_TEM     GCTTCCCGGC AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                660         670         680         690         700
NG_050238.  ACCACTTCTG CGCTCGGCCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT
1R-T_TEM     -----
2R-T_TEM     ACCACTTCTG CGCTCGGCCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT
5R-T_TEM     ACCACTTCTG CGCTCGGCCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                710         720         730         740         750
NG_050238.  CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA
1R-T_TEM     -----
2R-T_TEM     CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGAGGA--
5R-T_TEM     CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGAGGA--

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                760         770         780         790         800
NG_050238.  GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC
1R-T_TEM     -----
2R-T_TEM     -----
5R-T_TEM     -----

                                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                810         820         830         840         850
NG_050238.  AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA
1R-T_TEM     -----
2R-T_TEM     -----

```

```

5R-T_TEM -----

      ....|....| ....
              860
NG_050238. TTAAGCATTG GTAA
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----

```

```

TEM_R5 -----

      ....|....| .
              860
NG_050238. AGCATTGGTA A
TEM_R1 -----
TEM_R2 -----
TEM_R5 -----

```

**Lampiran 6. Aligment blaCTX-M *E. coli* sampel dengan referensi KX669628.1**

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
KX669628.1  AAGAGAGTGC AACGGATGAT GTTCGCGGCG GCGGCGTGCA TTCCGCTGCT
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
KX669628.1  GCTGGGCAGC GCGCCGCTTT ATGCGCAGAC GAGTGGGCGT CAGCAAAAGC
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150
KX669628.1  TGGCGGCGCT GGAGAAAAGC AGCGGAGGGC GGCTGGGCGT CGCGCTCATC
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160     170     180     190     200
KX669628.1  GATACCGCAG ATAATACGCA GGTGCTTTAT CGCGGTGATG AACGCTTTCC
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250
KX669628.1  AATGTGCAGT ACCAGTAAAG TTATGGCGGC CGCGGCGGTG CTTAAGCAGA
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260     270     280     290     300
KX669628.1  GTGAAACGCA AAAGCAGCTG CTTAATCAGC CTGTGCGAGAT CAAGCCTGCC
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350
KX669628.1  GATCTGGTTA ACTACAATCC GATTGCCGAA AAACACGTCA ACGGCACAAT
CTXM_R1     GACC-ATCAC GTCACAGT-- -ATTCATGGG AGCCACGAC- -----CATT
CTXM_R2     GACCCATCAC GTCACAGT-- -ATTCATGGG AGCCACGAC- -----CATT
CTXM_R5     GACC-ATCAC GTCACAGT-- -ATTCATGGG AGCCACGAC- -----CATT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360     370     380     390     400
KX669628.1  GACGCTGGCA GAACTGAGCG CGGCCGCGTT GCAGTACAGC GACAAT-ACC
CTXM_R1     TTCGCCGACA AAACCGA--- ---CGGCATG GGAAT-CATC AACCATGACC
CTXM_R2     TTCGCCGACA AAACCGA--- ---CGGCATG GGAAT-CATC AACCATGACC
CTXM_R5     TTCGCCGACA AAACCGA--- ---CGGCATG GGAAT-CATC AACCATGACC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

          410          420          430          440          450
KX669628.1 GCCATGAACA AATTGATTGC CCAGCTCGGT GGCCCGGGGAG GCGTGACGGC
CTXM_R1     AGCGCGT-CG TATTTATCCG CCAGATCG-- ----CAAACG CCTTTCAGGT
CTXM_R2     AGCGCGT-CG TATTTATCCG CCAGATCG-- ----CAAACG CCTTTCAGGT
CTXM_R5     AGCGCGT-CG TATTTATCCG CCAGATCG-- ----CAAACG CCTTTCAGGT

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          460          470          480          490          500
KX669628.1 TTTTGCCCGC GCGATCGGCG ATGAGACGTT TCGTCTGGAT CGCACTGAAC
CTXM_R1     TAGCGATCAC ACCATCCATA GAGA-ACACG CCATCAGTGG CGATCAGGA-
CTXM_R2     TAGCGATCAC ACCATCCATA GAGA-ACACG CCATCAGTGG CGATCAGGA-
CTXM_R5     TAGCGATCAC ACCATCCATA GAGA-ACACG CCATCAGTGG CGATCAGGA-

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          510          520          530          540          550
KX669628.1 CTACGCTGAA TACCGCCATT CCCGGCGACC CGAGAGACAC CACCACGCCG
CTXM_R1     -TATGACGAG CGCCCGCTTC ACGTGCTTCT TTCAGGCGAG CTTCCAGCTC
CTXM_R2     -TATGACGAG CGCCCGCTTC ACGTGCTTCT TTCAGGCGAG CTTCCAGCTC
CTXM_R5     -TATGACGAG CGCCCGCTTC ACGTGCTTCT TTCAGGCGAG CTTCCAGTTC

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          560          570          580          590          600
KX669628.1 CGGGCGATGG CGCAGACGTT GCGTCAGCTT ACGCTGGGTC ATGCGCTGGG
CTXM_R1     CA--CCATAT CGTTGTTGGC GTAACGGAA- ACGTTTTGCT TTACAC-AGA
CTXM_R2     GA--CCATAT CGTTGTTGGC ATAACGGAA- ACGTTTTGCT TTACAC-AGA
CTXM_R5     CA--CCATAT CGTTGTTGGC GTAACGGAA- ACGTTTTGCT TTACAC-AGA

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          610          620          630          640          650
KX669628.1 CGAAACCCAG CGGGCGCAGT TGGTGACGTG GCTCAAAGGC AATACGACCG
CTXM_R1     CGAACGCCAT CTAT----GA TAGAAGCGTG GCTCAAAGGC AATACGA---
CTXM_R2     CGAACGCCAT CAAT----GA TAGAAGCGTG GCTCAAAGGC AATACG----
CTXM_R5     CGAACGCCAT CTAT----GA TAGAAGCGTG GCTCAAAGGC AATACGA---

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          660          670          680          690          700
KX669628.1 GCGCAGCCAG CATTGCGGCC GGCTTACCGA CGTCGTGGAC TGTGGGTGAT
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          710          720          730          740          750
KX669628.1 AAGACCGGCA GCGGCGACTA CGGCACCACC AATGATATTG CGGTGATCTG
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          760          770          780          790          800
KX669628.1 GCCGCAGGGT CGTGCGCCGC TGGTTCGGT GACCTATTTT ACCCAGCCGC
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----
CTXM_R5     -----

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          810          820          830          840          850
KX669628.1 AACAGAACGC AGAGAGCCGC CGCGATGTGC TGGCTTCAGC GGCGAGAATC
CTXM_R1     -----
CTXM_R2     -----

```



```

CTXM_R5 -----

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      860      870      880      890      900
KX669628.1 ATCGCCGAAG GGCTGTAAAA -----
CTXM_R1 -----
CTXM_R2 -----
CTXM_R5 -----

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      910      920      930      940      950
KX669628.1 -----
CTXM_R1 -----
CTXM_R2 -----
CTXM_R5 -----

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      960      970      980      990     1000
KX669628.1 -----
CTXM_R1 -----
CTXM_R2 -----
CTXM_R5 -----

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      1010     1020     1030     1040     1050
KX669628.1 -----
CTXM_R1 -----
CTXM_R2 -----
CTXM_R5 -----

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      1060     1070     1080     1090     1100
KX669628.1 -----
CTXM_R1 -----
CTXM_R2 -----
CTXM_R5 -----

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      1110     1120     1130     1140     1150
KX669628.1 -----
CTXM_R1 -----
CTXM_R2 -----
CTXM_R5 -----

      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
      1160     1170     1180     1190
KX669628.1 -----
CTXM_R1 -----
CTXM_R2 -----
CTXM_R5 -----

```

Lampiran 7. Aligment ESBL *E. coli* dari sampel dengan berbagai referensi

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----
NG_050238. -----ATGAG TATTCAACAT TTTCGTGTCA CCCTTATTCC CTTTTTTGCG
KX669628.1 AAGAGAGTGC AACGGATGAT GTTCGCGGCG GCGGCGTGCA TTCCGCTGCT
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----
MT387477.1 -----ATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTCTG CCCTTATTCC CTTTTTTGCG
MW183893.1 -----
MW183897.1 -----
MT789719.1 -----ATGAG TATTCAACAT TTTCGTGTCTG CCCTTATTCC CTTTTTTGCG
MG653169.1 -----ATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTCTG CCCTTATTCC CTTTTTTGCG

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60      70      80      90      100
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----
NG_050238. GCATTTTGGCC TTCCTGTTTT -TGCTCACCC AGAAACGCTG --GTGAAAGT
KX669628.1 GCTGGGCAGC GCGCCGCTTT ATGCGCAGAC GAGTGCGGTG CAGCAAAAGC
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----
MT387477.1 GCATTTTGGCC TTCCTGTTTT -TGCTCACCC AGAAACGCTG --GTGAAAGT
MW183893.1 GCATTTTGGCC TTCCTGTTTT -TGCTCACCC AGAAACGCTG --GTGAAAGT
MW183897.1 GCATTTTGGCC TTCCTGTTTT -TGCTCACCC AGAAACGCTG --GTGAAAGT
MT789719.1 GCATTTTGGCC TTCCTGTTTT -TGCTCACCC AGAAACGCTG --GTGAAAGT
MG653169.1 GCATTTTGGCC TTCCTGTTTT -TGCTCACCC AGAAACGCTG --GTGAAAGT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110     120     130     140     150
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----
NG_050238. AAAAGATGCT GAAGATCAGT TG-GGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG
KX669628.1 TGGCGGCGCT GGAGAAAAGC AGCCGAGGGC GGCTGGG--- CGTCGCGCTC
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----
MT387477.1 AAAAGATGCT GAAGATCAGT TG-GGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG
MW183893.1 AAAAGATGCT GAAGATCAGT TG-GGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG
MW183897.1 AAAAGATGCT GAAGATCAGT TG-GGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG
MT789719.1 AAAAGATGCT GAAGATCAGT TG-GGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG
MG653169.1 AAAAGATGCT GAAGATCAGT TG-GGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160     170     180     190     200
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----
NG_050238. GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTTCGCCCCG AAGAACGTTT
KX669628.1 ATCGATAACG CAGATAATAC GCAGGTGCTT TATCGCGGTG ATGAACGCTT
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----
MT387477.1 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTTCGCCCCG AAGAACGTTT
MW183893.1 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTTCGCCCCG AAGAACGTTT
MW183897.1 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTTCGCCCCG AAGAACGTTT

```

MT789719.1 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCGG AAGAACGTTT  
 MG653169.1 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCGG AAGAACGTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                   210                  220                  230                  240                  250

1R-T\_TEM -----GATTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC  
 2R-T\_TEM -----CGTTTT AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC  
 5R-T\_TEM -----ATTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGTGCG GTATTATCCC  
 NG\_050238.1 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGTGCG GTATTATCCC  
 KX669628.1 TCCAATGTGC AGTACCAGTA AAGTTATGGC GCCCGCGGCG GTGCTTAAGC  
 1R-C\_CTXM -----  
 2R-C\_CTXM -----  
 5R-C\_CTXM -----  
 MT387477.1 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC  
 MW183893.1 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC  
 MW183897.1 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGTGCG GTATTATCCC  
 MT789719.1 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC  
 MG653169.1 TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                   260                  270                  280                  290                  300

1R-T\_TEM GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 2R-T\_TEM GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 5R-T\_TEM GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 NG\_050238.1 GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 KX669628.1 AGAGTGA AAC GCAAAGCAG CTGCTTAATC AGCCTGTGGA GATCAAGCCT  
 1R-C\_CTXM -----  
 2R-C\_CTXM -----  
 5R-C\_CTXM -----  
 MT387477.1 GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 MW183893.1 GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 MW183897.1 GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 MT789719.1 GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG  
 MG653169.1 GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                   310                  320                  330                  340                  350

1R-T\_TEM AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 2R-T\_TEM AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 5R-T\_TEM AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 NG\_050238.1 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 KX669628.1 GCCGATCTGG TTAAC TACAA TCCGATTGCC GAAAACACG TCAACGGCAC  
 1R-C\_CTXM -----  
 2R-C\_CTXM -----  
 5R-C\_CTXM -----  
 MT387477.1 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 MW183893.1 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 MW183897.1 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 MT789719.1 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 MG653169.1 AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                   360                  370                  380                  390                  400

1R-T\_TEM CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA  
 2R-T\_TEM CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA  
 5R-T\_TEM CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA  
 NG\_050238.1 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA  
 KX669628.1 AATGACGCTG GCAGAACTGA GCGCGGCCGC GTTGAGTAC AGCGACAATA  
 1R-C\_CTXM CGTCACAGTA TTCATGGGAG CCACGACCAT TTTCGCCGAC AAAACCGACG  
 2R-C\_CTXM CGTCACAGTA TTCATGGGAG CCACGACCAT TTTCGCCGAC AAAACCGACG  
 5R-C\_CTXM CGTCACAGTA TTCATGGGAG CCACGACCAT TTTCGCCGAC AAAACCGACG  
 MT387477.1 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA  
 MW183893.1 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA

```

MW183897.1 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA
MT789719.1 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA
MG653169.1 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410          420          430          440          450
1R-T_TEM CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
2R-T_TEM CTGCTGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
5R-T_TEM CTGCTGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
NG_050238. CTGCTGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
KX669628.1 CCGCCATGAA CAAATTGATT GCCCAGCTCG GTGGCCCGGG AGGCGTGACG
1R-C_CTXM GCATGGGAAT CATCAACCAT GACCAGCGCG TCGTATTTAT CCGCCAGATC
2R-C_CTXM GCATGGGAAT CATCAACCAT GACCAGCGCG TCGTATTTAT CCGCCAGATC
5R-C_CTXM GCATGGGAAT CATCAACCAT GACCAGCGCG TCGTATTTAT CCGCCAGATC
MT387477.1 CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
MW183893.1 CTGCTGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
MW183897.1 CTGCTGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
MT789719.1 CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC
MG653169.1 CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
1R-T_TEM GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
2R-T_TEM GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
5R-T_TEM GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
NG_050238. GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
KX669628.1 GCTTTTTTGC GCGCGATCGG CGATGAGACG TTTCGTCTGG ATCGCACTGA
1R-C_CTXM GCAAACGCCT TTCAGGTTAG CGATCACACC ATCCATAGAG AACACGCC--
2R-C_CTXM GCAAACGCCT TTCAGGTTAG CGATCACACC ATCCATAGAG AACACGCC--
5R-C_CTXM GCAAACGCCT TTCAGGTTAG CGATCACACC ATCCATAGAG AACACGCC--
MT387477.1 GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
MW183893.1 GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
MW183897.1 GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
MT789719.1 GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA
MG653169.1 GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510          520          530          540          550
1R-T_TEM ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACCA CG----AGCG TGACACCA?G
2R-T_TEM ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG
5R-T_TEM ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG
NG_050238. ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG
KX669628.1 ACCTACGCTG AATACCGCCA TTCCCGGCGA CC----CGAG AGACACCACC
1R-C_CTXM ATCAGTGGCG A-TCAGGATA TGACGAGCGC CCGCTTCACG TGCTTCTTTC
2R-C_CTXM ATCAGTGGCG A-TCAGGATA TGACGAGCGC CCGCTTCACG TGCTTCTTTC
5R-C_CTXM ATCAGTGGCG A-TCAGGATA TGACGAGCGC CCGCTTCACG TGCTTCTTTC
MT387477.1 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG
MW183893.1 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG
MW183897.1 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG
MT789719.1 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG
MG653169.1 ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CG----AGCG TGACACCACG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560          570          580          590          600
1R-T_TEM ATGCCTGTAG CTATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGTGAAC
2R-T_TEM ATGCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC
5R-T_TEM ATGCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC
NG_050238. ATGCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC
KX669628.1 ACGCCGCGGG CGATGGCGCA GACGTTGC-G TCAGCTACG CTGGGTCATG
1R-C_CTXM AGGCGAGCTT CCAGCTCCAC CATATCGTTG TTGGCGTAAC GGAAACGTTT
2R-C_CTXM AGGCGAGCTT CCAGCTCCAC CATATCGTTG TTGGCGTAAC GGAAACGTTT
5R-C_CTXM AGGCGAGCTT CCAGTTCCAC CATATCGTTG TTGGCGTAAC GGAAACGTTT
MT387477.1 ATGCCTGTAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC

```

```

MW183893.1 ATGCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC
MW183897.1 ATGCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC
MT789719.1 ATGCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC
MG653169.1 ATGCCTGTAG CAATGGCAAC AACGTTGC-G CAAACTATTA ACTGGCGAAC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650
1R-T_TEM TACTTACTCT AGCTTCCC GG TAA-----
2R-T_TEM TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG
5R-T_TEM TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG
NG_050238. TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG
KX669628.1 CGCTGGGCGA AACCAGCGG GCGCAGT--T GGTGACGTGG CTCAAAGGCA
1R-C_CTXM TGCTTTACAC AGACGAACGC CATCTATGAT AGAAGCGTGG CTCAAAGGCA
2R-C_CTXM TGCTTTACAC AGACGAACGC CATCAATGAT AGAAGCGTGG CTCAAAGGCA
5R-C_CTXM TGCTTTACAC AGACGAACGC CATCTATGAT AGAAGCGTGG CTCAAAGGCA
MT387477.1 TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG
MW183893.1 TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG
MW183897.1 TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG
MT789719.1 TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG
MG653169.1 TACTTACTCT AGCTTCCC GG CAACAAT--T AATAGACTGG ATGGAGGCGG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT
5R-T_TEM ATAAAGTTGC A-----
NG_050238. ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT
KX669628.1 ATACGACCGG CGCAGCCAGC ATTCGGGCCG GCTTACCGAC GTCGTGGACT
1R-C_CTXM ATACGA-----
2R-C_CTXM ATACG-----
5R-C_CTXM ATACGA-----
MT387477.1 ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT
MW183893.1 ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT
MW183897.1 ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT
MT789719.1 ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT
MG653169.1 ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC
5R-T_TEM -TTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC
NG_050238. ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC
KX669628.1 GTGGGTGATA AGACCGGCAG CGCCGACTAC GGCACCACCA ATGATATTGC
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----
MT387477.1 ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC
MW183893.1 ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC
MW183897.1 ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC
MT789719.1 ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC
MG653169.1 ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770          780          790          800
1R-T_TEM -----
2R-T_TEM AGCACTGAGG A-----
5R-T_TEM AGCACTGAGG AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC TGGCTGGTTT
NG_050238. AGCACTGGGG CCAGATGGTA A-GCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG
KX669628.1 GGTGATCTGG CCGCAGGGTC GTGCGCGGCT G-GTTCCTGGT GACCTATTTT
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----

```

```

MT387477.1 AGCACTGGGG CCAGATGGTA A-GCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG
MW183893.1 AGCACTGGGG CCAGATGGTA A-GCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG
MW183897.1 AGCACTGGGG CCAGATGGTA A-GCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG
MT789719.1 AGCACTGGGG CCAGATGGTA A-GCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG
MG653169.1 AGCACTGGGG CCAGATGGTA A-GCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810          820          830          840          850

```

```

1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM A-----
NG_050238.1 ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT
KX669628.1 ACCCAGCEGC AACAGAACGC AGAGAGCCGC CGCGATGTGC TGGCTTCAGC
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----
MT387477.1 ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT
MW183893.1 ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT
MW183897.1 ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT
MT789719.1 ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT
MG653169.1 ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|..
          860          870          880

```

```

1R-T_TEM -----
2R-T_TEM -----
5R-T_TEM -----
NG_050238.1 AG-GTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAA- -----
KX669628.1 GCGGAGAATC ATCGCCGAAG GGCTGTAAAA -----
1R-C_CTXM -----
2R-C_CTXM -----
5R-C_CTXM -----
MT387477.1 AG-GTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAA- -----
MW183893.1 AG-GTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAA- -----
MW183897.1 AG-GTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAA- TGTCAGA
MT789719.1 AG-GTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAA- -----
MG653169.1 AG-GTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAA- -----

```

**Lampiran 8. Rekapitulasi sampel penelitian**

Kode	Hasil Kultur	Kode (+)	Lokasi	Jumlah IB	Nama Peternak
1	+	1R	Kopang MB	4	H. Marjun
2	+	2R	Kopang MB	3	H. Marjun
3	+	3R	Kopang MB	9	Harkan
4	-	-	Kopang MB	3	Harkan
5	-	-	Kopang MB	4	Lalu Bibin
6	-	-	Kopang MB	3	Lalu Bibin
7	-	-	Kopang MB	4	Amaq Lalu Bibin
8	-	-	Kopang MB	5	Amaq Lalu Bibin
9	-	-	Terara Lando	4	Sukri
10	-	-	Terara Lando	4	Sunardi
11	+	5R	Terara Lando	3	Paozan
12	+	6R	Terara Lando	3	Saparudin
13	-	-	Terara Lando	4	Sudirman
14	-	-	Terara Lando	4	Amaq Santri
15	-	-	Terara Lando	3	Suharman
16	-	-	Terara Lando	3	Hasan
17	-	-	Pringga Jurang	4	M. Nur Aksan
18	-	-	Pringga Jurang	3	Pajarudin
19	-	-	Pringga jurang	3	Pak Jaelani
20	-	-	Pringga jurang	3	Lalu Hendrawan
21	-	-	Pringga jurang	7	Pak Sujaan
22	-	-	Pringga jurang	4	Amaq L. Hendrawan